

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Le contrôle de l'hypertrophie cardiaque par la moxonidine

par

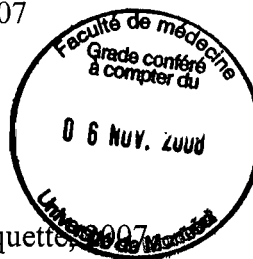
Pierre-Alexandre Paquette

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Sciences Biomédicales

Novembre 2007



© Pierre-Alexandre Paquette, 2007

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Le contrôle de l'hypertrophie cardiaque par la moxonidine

présentée par :

Pierre-Alexandre Paquette

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

D^r Christian Deschepper, président-rapporteur

D^{re} Suhayla Mukaddam-Daher, directeur de recherche

D^r Jean St-Louis, membre du jury

Résumé

En hypertension, l'hypertrophie du ventricule gauche (HVG) se développe en réponse à une augmentation du travail du cœur et une stimulation des neurohormones, mais c'est un processus maladapté associé à une augmentation des risques cardiovasculaires. L'apoptose des cardiomyocytes hypertrophiés cause une détérioration de la fonction cardiaque, menant à l'insuffisance cardiaque. La régression de l'hypertrophie cardiaque est associée avec une réduction des complications de l'hypertension. La moxonidine, un composé imidazolinique antihypertensif, réduit la pression sanguine principalement par l'inhibition centrale du flux sympathique. Cette étude porte sur les effets de la moxonidine sur l'HVG et sur les mécanismes impliqués. Des rats spontanément hypertendus (SHR, âgés de 12 semaines) ont reçu la moxonidine (mini-pompes osmotiques, s.c.) à des concentrations de 0, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/kg/h}$ pendant 4 semaines. La mesure en continue de la pression sanguine par télémetrie a démontré que les doses de 200 et 400 $\mu\text{g/kg/h}$ de moxonidine réduisent la pression artérielle moyenne aux niveaux les plus bas après 3-4 jours. La pression artérielle est ensuite stabilisée à $-9,0 \pm 0,2$ et $-10,8 \pm 0,2$ mmHg ($P < 0,01$ vs. véhicule), respectivement, après 1 semaine et est maintenue à ces niveaux pendant les 4 semaines de traitement. Le traitement à la moxonidine pendant 4 semaines (400 μg) a réduit la masse ($86 \pm 3\%$, $P < 0,001$) et le contenu en ADN du ventricule gauche ($69 \pm 6\%$, $P < 0,01$) et a inhibé la synthèse de l'ADN ($57 \pm 2\%$, $P < 0,01$), déterminée par l'incorporation *in vivo* de ^3H -thymidine. La fragmentation de l'ADN est augmentée après 1 semaine de traitement et cette augmentation est parallèle à l'augmentation de caspase-3 activée. Le traitement à la moxonidine (400 μg) a diminué l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax ($82 \pm 6\%$, $P < 0,02$) et toutes les doses ont augmenté l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 après 4 semaines de traitement. Cette étude démontre l'implication de la modulation de l'ADN cardiaque dans le contrôle de la masse du ventricule gauche par la moxonidine dans un modèle de rat hypertendus.

Mots-clés : hypertension, hypertrophie du ventricule gauche, moxonidine, apoptose, ADN .

Abstract

In hypertension, left ventricular hypertrophy (LVH) develops in response to increased cardiac workload and stimulated neurohormones but it is a maladaptive process associated with increased cardiovascular risk. Apoptosis of hypertrophied cardiomyocytes causes the heart function to deteriorate, leading to heart failure. Regression of cardiovascular hypertrophy is associated with reduced complications of hypertension. Moxonidine is an antihypertensive imidazoline compound that reduces blood pressure primarily by central inhibition of sympathetic outflow. This study investigated the effect of moxonidine on LVH and the mechanisms involved in this effect. Spontaneously hypertensive rats (SHR, 12 weeks old) were treated with moxonidine (via Alzet osmotic mini-pumps, s.c.) at 0, 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{g/kg/h}$ over 4 weeks. Continuous monitoring of blood pressure by telemetry showed that 200 and 400 $\mu\text{g/kg/h}$ moxonidine decreased mean arterial pressure to lowest levels after 3-4 days, then stabilized at -9.0 ± 0.2 and -10.8 ± 0.2 mmHg ($P < 0.01$ vs. vehicle), respectively, at 1 week and was maintained as such over the 4 weeks of treatment. Compared to vehicle-treated rats (100%), 4 weeks of moxonidine (400 μg) reduced left ventricular mass to $86 \pm 3\%$ ($P < 0.01$), reduced left ventricular DNA content ($69 \pm 6\%$, $P < 0.01$), and inhibited DNA synthesis ($57 \pm 2\%$, $P < 0.01$), determined as *in vivo* ^3H -thymidine incorporation. DNA fragmentation transiently increased at 1 week of treatment and was paralleled by elevated active caspase-3 protein. Moxonidine (400 μg) significantly decreased the apoptotic protein Bax ($82 \pm 6\%$, $P < 0.02$), and all doses stimulated anti-apoptotic Bcl-2 after 4 weeks of treatment. These studies implicate the modulation of cardiac DNA dynamics in the control of left ventricular mass by moxonidine in a rat model of hypertension.

Keywords : hypertension, left ventricular hypertrophy, moxonidine, apoptosis, DNA.

Table des matières

1. Introduction	1
1.1 La pression artérielle	1
1.1.1 Hypertension artérielle	2
1.1.1.1 Hypertension secondaire	2
1.1.1.2 Hypertension essentielle.....	3
1.1.2 Système rénine-angiotensine-aldostérone	5
1.1.3 Système nerveux sympathique	8
1.2 Hypertrophie du ventricule gauche	12
1.2.1 Hypertrophie des cardiomyocytes.....	13
1.2.2 Prolifération des fibroblastes et fibrose.....	14
1.2.3 Mort des cardiomyocytes	14
1.2.4 Protéines impliquées dans l'apoptose	16
1.2.4.1 Les caspases	18
1.2.4.2 Les protéines de la famille de Bcl-2.....	19
1.2.4.2.1 Bax	19
1.2.4.2.2 Bcl-2	19
1.3 Modèles animaux de l'hypertension artérielle	20
1.3.1 SHR	21
1.3.2 Rats Dahl sensibles au sel	22
1.3.3 Rats TGR(mREN2)27	23
1.3.4 Rats <i>two-kidney one-clip</i>	24
1.3.5 Rats DOCA-sel.....	25
1.4 Traitements de l'hypertension artérielle.....	26
1.4.1 Classes de médicaments	26
1.4.1.1 Les diurétiques	26
1.4.1.2 Les vasodilatateurs	27
1.4.1.3 Les bloqueurs des canaux calciques.....	28

1.4.1.4 Les ARB, les IECA et les inhibiteurs de rénine.....	28
1.4.1.5 Les inhibiteurs du système nerveux sympathique.....	30
1.4.1.5.1 Récepteurs aux imidazolines.....	32
1.4.2 Effets bénéfiques sur l'hypertrophie	33
1.5 Objectifs	35
2. Article : Control of Left Ventricular Mass by Moxonidine Involves Reduced DNA Synthesis and Enhanced DNA Fragmentation.	36
2.1 Abstract	39
2.2 Introduction	40
2.3 Methods.....	41
2.4 Results	46
2.5 Discussion	48
2.6 References	55
2.7 Figure legends, figures and table	60
3. Discussion	69
3.1 Conclusion.....	79
3.2 Perspectives.....	80
4. Bibliographie.....	82

Liste des figures

Figure 1. Prédispositions génétiques et facteurs environnementaux impliqués dans l'hypertension essentielle. (Oparil et al, 2003)	4
Figure 2. Cascade bioenzymatique du système rénine-angiotensine-aldostérone et les sites d'action des inhibiteurs de rénine, des IECA et des ARB. (Adaptée de Dinh et al, 2001; Lavoie et Sigmund, 2003).....	8
Figure 3. Schéma de la biosynthèse de la norépinéphrine.	12
Figure 4. Voies de signalisation de l'apoptose. (Kang et Izumo, 2003).	17
Figure 5. Étiologie des modèles des rats en hypertension (Adaptée de Pinto et al, 1998) ..	21
Figure 6. Domaines et motifs majeurs de la protéine IRAS/Nischarin (Sun et al, 2007)	33
Figure 7. Schéma hypothétique de l'action de la moxonidine sur les fibroblastes cardiaques et sur les cardiomyocytes	81

Abbreviations

2K1C : *Two-kidney one-clip*

ABTS : 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazolinesulfonate)

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Ang (1-7) : Angiotensine (1-7)

Ang (1-9) : Angiotensine (1-9)

Ang (3-8) : Angiotensine (3-8)

Ang-II : Angiotensine II

Ang-IV : Angiotensine IV ou Angiotensine (3-8)

ANOVA : *ANalysis Of VAriance*

ANP : Peptide Natriurétique Auriculaire

Apaf-1 : *Apoptosis protease-activating factor-1*

ARB : Bloqueur des Récepteurs de l'Angiotensine

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

AT₁-R : Récepteur de l'Angiotensine de type 1

AT₍₁₋₇₎-R : Récepteur de l'Angiotensine (1-7)

AT₂-R : Récepteur de l'Angiotensine de type 2

AT₄-R : Récepteur de l'Angiotensine de type 4

ATP : Adénosine TriPhosphate

Bax : Protéine X Associée à Bcl-2

Bcl-2 : *B-cell lymphoma 2*

BNP : Peptide Natriurétique du cerveau

CAGE : *Chymostatin-sensitive Angiotensine-II Generating Enzyme*

cAMP : *cyclic Adenosine MonoPhosphate*

CHUM : Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

CIPA : Comité Institutionnel de Protection des Animaux

dCTP : DéoxyCytidine TriPhosphate

DO : Densité Optique

DOCA : DéOxyCorticostérone Acétate
DOPA : 3,4-DihydrOxyPhénylAlanine
ECA : Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
ECA-2 : Enzyme de Conversion de l'Angiotensine de type 2
EDTA : Acide Éthylène-Diamine-Tétraacétique
ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay*
ERK : *Extracellular signal Regulated Kinase*
FADD : *Fas-Associated Death Domain*
FasL : Fas ligand
GTP : Guanosine TriPhosphate
HPS : Hématoxyline Phloxine Saffron
HTA : HyperTension Artérielle
HVG : Hypertrophie du Ventricule Gauche
I₁ : Récepteurs aux imidazolines de type 1
I₂ : Récepteurs aux imidazolines de type 2
I₃ : Récepteurs aux imidazolines de type 3
IECA : Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
IRAS : *Imidazoline Receptor Antisera-Selected*
LVH : *Left Ventricular Hypertrophy*
MAPkinase : *Mitogen-Activated Protein kinase*
mmHG : millimètres de mercure
NE : NorÉpinéphrine
PC-PLC : Phosphotidyl Choline-PhosphoLipase C
PKA : Protéine Kinase A
PMSF : PhenylMéthaneSulphonylFluoride
RIPA : *RadioImmunoPrecipitation Assay*
RNase : Ribonucléase
RVLM : Médulla Rostro-Ventro-Latérale

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SHR : Rat spontanément hypertendu

SHR-SP : Rat spontanément hypertendu stroke-prone

SNA : Système Nerveux Autonome

SNC : Système Nerveux Central

SNS : Système Nerveux Sympathique

SRAA : Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone

TGF- β : Facteur de croissance β transformant

TGR : Rats transgéniques

tPA : *tissue Plasminogen Activator*

WKY : Wistar-KYoto

Remerciements

Ce mémoire n'aurait jamais vu le jour sans le soutien de ma directrice, D^{re}. Suhayla Mukaddam-Daher. Merci Suhayla pour l'aide apportée durant toute ma maîtrise dans votre laboratoire. Les précieux conseils apportés m'aideront beaucoup pour le futur.

J'aimerais remercier les D^r. Gutkowska et Jankowski. J'aimerais remercier spécialement Ahmed pour tous ses conseils et pour les nombreuses réponses qu'il m'a donnés au cours de mon passage au laboratoire. J'aimerais aussi remercier Valérie, Wang, Bogdan, Safia et tous ceux que j'ai eu la chance de connaître durant ces années passées au laboratoire.

J'aimerais remercier le Dr. DeBlois pour m'avoir accueilli dans son laboratoire le temps de quelques expériences et d'avoir pris le temps de discuter des résultats obtenus. J'aimerais remercier aussi David qui m'a supervisé lors des différentes expériences et pour son aide apportée lors de l'interprétation des résultats.

Je m'en voudrais de passer sous silence le soutien exemplaire de ma famille durant toutes mes études. Un grand merci à Karine qui m'a soutenu et encouragé tout au long de ma maîtrise.

1. Introduction

1.1 La pression artérielle

La pression sanguine ou artérielle est la force motrice qui fait circuler le sang à travers tous les organes. Le débit cardiaque, le volume sanguin et la résistance périphérique sont les trois déterminants majeurs de la pression artérielle (Lavie et Messerli, 1986). La pression sanguine est le résultat du débit cardiaque multiplié par la résistance rencontrée à l'intérieur du système circulatoire (résistance périphérique totale).

La pression artérielle est exprimée par deux chiffres : le plus élevé correspond à la pression artérielle systolique, mesurée lors la contraction du cœur, tandis que le second, moins élevé, est le témoin de la pression artérielle diastolique, mesurée lors du relâchement du muscle cardiaque (Smulyan et Safar, 1997). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, une pression sanguine est optimale aux alentours de 120 millimètres de mercure (mmHG) systolique et 80 mmHG diastolique, soit 120/80. Le corps humain possède plusieurs mécanismes qui garantissent l'homéostasie de la pression sanguine, c'est-à-dire qu'ils assurent un apport sanguin adéquat à tous les organes et aussi une adaptation rapide à tout événement qui sollicite plus ou moins de sang dans un organe particulier ou dans l'organisme entier (Lohmeier et al, 1996). Ces mécanismes sont de type nerveux, hormonaux et rénaux et ils sont en mesure de modifier le débit cardiaque, la résistance périphérique et/ou le volume sanguin (Guyton et al, 1976). Le système nerveux central (SNC) joue un rôle important dans la régulation de la pression sanguine en contrôlant à la fois l'activité du système autonome (SNA) et le relâchement des hormones (Biaggioni, 2007). De leur côté, le rein et les mécanismes humoraux, transmis par l'intermédiaire d'hormones circulantes et de substances vasoactives produites localement, jouent un rôle important dans le contrôle de la pression artérielle à long terme (Guyton, 1991). Lorsqu'un ou plusieurs de ces mécanismes sont altérés, l'homéostasie de la pression sanguine n'est

plus assurée et il peut s'en suivre des complications, telle que l'hypertension (Sleight, 1984).

1.1.1 Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle (HTA) est une condition médicale dans laquelle le patient possède une pression sanguine élevée de manière chronique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'hypertension artérielle est définie comme une pression systolique/diastolique $\geq 140/90$ mmHg. De manière théorique, l'hypertension peut résulter d'une augmentation du débit cardiaque et/ou de la résistance périphérique. L'hypertension chronique est un des facteurs de risque des crises cardiaques, de l'insuffisance cardiaque et rénale et des accidents vasculaires cérébraux (Flack et al, 2003). Une augmentation de la pression systolique de 20 mmHg ou de la pression diastolique de 10 mmHg est associée avec deux fois plus de mortalité cardiovasculaire (Lewington et al, 2002). L'hypertension peut être catégorisée en hypertension secondaire ou hypertension essentielle (primaire).

1.1.1.1 Hypertension secondaire

L'hypertension secondaire est caractérisée par une haute pression sanguine résultante d'une autre maladie comme d'une maladie des reins ou même de certaines tumeurs (Onusko, 2003). L'âge est un facteur déterminant puisque plus on vieillit, plus les artères se durcissent (Safar et al, 2002). Certains médicaments provoquent une hypertension: les antimigraineux, les stéroïdes, les agents immunosuppresseurs, les antidépresseurs, la cortisone, les anti-inflammatoires non-stéroïdes et les pilules contraceptives (Ferrari, 2003; Gyamlani et Geraci, 2007; Mulatero et al, 2002). De plus, un mauvais fonctionnement des glandes surrénales peut amener celles-ci à sécréter un surplus d'hormones qui ont un effet hypertenseur, tels que l'adrénaline, le cortisol et l'aldostérone (Blumenfeld, 1993). Certaines atteintes rénales provoquent une hypertension, comme par exemple le blocage d'une artère amenant le sang au rein (Streeten et Anderson, 1992). Le rein, qui est moins irrigué, perçoit une baisse de pression et fabrique, en conséquence, des

substances, comme la rénine qui active l'angiotensine et, conséquemment, l'aldostérone, qui ont un effet hypertenseur par vasoconstriction et rétention du sodium (Kalra, 2007). Les reins peuvent aussi être directement atteints d'une maladie de manière aiguë ou chronique, ce qui peut entraîner une insuffisance rénale. Étant donné le rôle majeur des reins sur la résistance vasculaire périphérique et sur le maintien du volume des fluides extracellulaires (Wesson, 2001), la perte de la fonction rénale entraîne l'hypertension par une rétention du sodium et une expansion du volume sanguin, accompagné par une incapacité à autoréguler le système vasculaire périphérique (Campese et Park, 2006). Toutes ces formes d'hypertension sont donc caractérisées dans la catégorie d'hypertension secondaire.

1.1.1.2 Hypertension essentielle

L'hypertension essentielle est plus fréquente (près de 90% des cas) et semble être causée par des interactions complexes entre la prédisposition génétique et des facteurs environnementaux (Messerli et al, 2007) (voir Figure 1).

La prédisposition de l'hypertension essentielle est multifactorielle et pourrait être activée par les facteurs environnementaux comme l'obésité, de faibles niveaux d'activité physique, une diète riche en sodium, une diète inadéquate en calcium et potassium, des hauts niveaux de stress, l'âge, le sexe, la cigarette, la résistance à l'insuline, le diabète et les facteurs démographiques (Ruppert et Maisch, 2003).

Aussi, l'hypertension essentielle est fortement associée à des composantes génétiques affectant les mécanismes régulateurs de la pression sanguine (Naber et Siffert, 2004). Les facteurs les plus importants sont l'hyperactivité du système nerveux sympathique (SNS) et du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Ces systèmes induisent la recapture du sodium et la libération d'hormones vasoconstrictrices. De plus, une déficience des vasodilatateurs, comme l'oxyde nitrique et l'ANP, des altérations dans l'expression des systèmes affectants le tonus vasculaire et l'utilisation du sel, l'augmentation de l'activité des facteurs de croissances vasculaires, la dysfonction

endothélique, l'augmentation du stress oxydatif et l'altération des récepteurs adrénergiques qui régulent le rythme cardiaque, la force de contraction et le tonus vasculaire sont tous des facteurs qui peuvent être impliqués en hypertension essentielle. Ces propriétés héréditaires sont présentes dans toutes les cellules, mais particulièrement proéminentes dans les cellules des muscles lisses du système vasculaire à cause de leur adaptation et leur différenciation. Elles peuvent aussi se manifester en une réactivité augmentée face aux substances vasoactives, comme la norépinéphrine (NE) et l'angiotensine-II (Ang-II) (Mendlowitz, 1991).

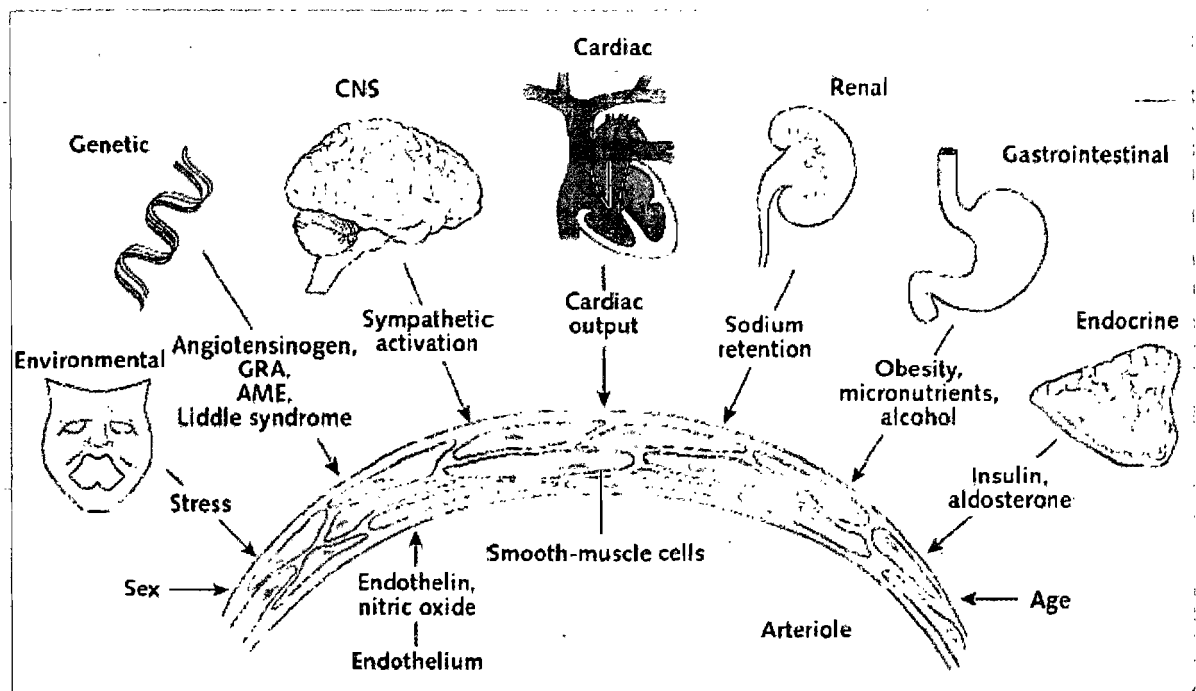


Figure 1. Prédispositions génétiques et facteurs environnementaux impliqués dans l'hypertension essentielle. (Oparil et al, 2003)

1.1.2 Système rénine-angiotensine-aldostérone

La rénine est le facteur limitant du SRAA. Sa sécrétion peut être induite par une stimulation β -adrénergique, une baisse de pression dans l'artériole et une diminution de NaCl dans la macula densa (Persson et al, 2004). En contrepartie, l'augmentation du NaCl dans la macula densa, de même que l'Ang-II, diminue la production et la sécrétion de la rénine. La rénine sécrétée diffuse dans les compartiments plasmatiques, lymphatique et interstitiels (van den Eijnden et al, 2003). Son substrat principal est l'angiotensinogène, une glycoprotéine synthétisée et sécrétée par le foie, qu'elle clivera en angiotensine I (Ang-I). La rénine, en plus de son action de protéase clivant l'angiotensinogène en Ang-I, pourrait aussi se lier aux récepteurs de rénine, présents dans la couche sub-endothéliale des coronaires et des artères rénaux (Nguyen et al, 2002). Sa liaison aux récepteur de rénine multiplie par quatre son activité catalytique de conversion de l'angiotensinogène en Ang-1 (Nguyen et al, 2004). Aussi, sa liaison au récepteur induit l'activation de ERK 1 et 2 qui sont impliqués dans l'hypertrophie et la prolifération cellulaire (Nguyen et al, 2002).

L'Ang-I est clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) pour produire l'Ang-II, composant le plus actif du SRAA (Voir Figure 2). L'ECA est aussi responsable de la dégradation de la bradykinine (vasodilatateur et natriurétique) en métabolites inactifs (Carey et Siragy, 2003).

Les actions de l'Ang-II sont transmises par l'intermédiaire des récepteurs hautement spécifiques qui font partie de la grande famille des récepteurs à sept domaines trans-membranaires. L'Ang-II induit l'hypertrophie et l'hyperplasie des cellules cardiaques et vasculaires par son activation directe sur le récepteur à angiotensine de type 1 (AT_1 -R) et indirectement par la stimulation de cytokines et de facteurs de croissance (McConnaughey et al, 1999). L'activation des récepteurs AT_1 -R par l'Ang-II active la protéine kinase C qui entraîne l'activation de Ras/Raf, puis la stimulation de la phosphorylation des protéines de la voie de signalisation des MAPkinases. Celles-ci induisent l'expression de gènes

impliqués dans la vasoconstriction, la croissance cellulaire, la prolifération cellulaire et la synthèse protéique (Mulvany, 2002). L'Ang-II fait augmenter la pression sanguine par plusieurs mécanismes : la constriction des vaisseaux, la stimulation de la synthèse et du relâchement de l'aldostérone, la réabsorption tubulaire du sodium (directement et indirectement par l'aldostérone), la stimulation de la soif, le relâchement d'hormones antidiurétiques et la stimulation du SNS (Lavoie et Sigmund, 2003).

L'activation des récepteurs à angiotensine de type II (AT₂-R) stimule une phosphatase qui inactive les MAPkinases, les protéines clé impliquées dans la transduction des signaux du AT₁-R. Donc, l'activation du AT₂-R pourrait en partie opposer les effets biologiques de l'activation du AT₁-R, entraînant une vasodilatation et l'inhibition de la croissance et de la différenciation cellulaire (Tea et al, 2000; Carey et Siragy, 2003).

En l'an 2000, l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ECA-2) a été découverte et caractérisée comme une enzyme semblable à l'ACE (Tipnis et al, 2000). Contrairement à l'ACE, le site d'action de l'ACE-2 contient une carboxypeptidase au lieu d'une carboxypeptidase dipeptidyl, ce qui est responsable des changements dans la spécificité entre ces deux enzymes. À cause de cette différence, l'ACE-2 hydrolyse l'Ang-I en Ang (1-9) et l'Ang-II en Ang (1-7). De plus, l'ACE-2 ne convertit pas l'Ang-I en Ang-II et son activité enzymatique n'est pas inhibée par les IECA. L'ACE-2 a été localisée dans les membranes cellulaires des cardiomyocytes, des cellules endothéliales et tubulaires du rein et dans les testicules (Donoghue et al, 2000).

Il a été démontré que les peptides agonistes fragments de l'Ang-II possèdent aussi des actions physiologiques sur leur récepteur respectif. L'Ang (1-7), qui provient de la conversion de l'Ang-II par l'ACE-2, se lie à son récepteur AT₍₁₋₇₎-R et oppose les actions de l'Ang-II par une stimulation de l'oxyde nitrique et des prostaglandines vasodilatrices et peut potentialiser les actions de la bradykinine sur son récepteur B₂ en se liant au site actif de l'ECA (Paula et al, 1995). Les aminopeptidases A et N dégradent l'Ang-II en Ang IV (Ang (3-8)). Il a été démontré que l'Ang IV induit une vasodilatation au niveau de

l'artère pulmonaire porcine (Hill-Kapturczak et al, 1999) et une augmentation du débit sanguin rénal chez le rat (Abrahamsen et al, 2002).

Des études ont mis en évidence qu'une partie ou la totalité des éléments du SRAA peuvent être présents dans de nombreux tissus faisant du SRAA un système quasi-ubiquitaire et impliqué dans des régulations paracrines (Ganten et al, 1983; Phillips et al, 1993). L'ECA est retrouvée à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux et la rénine peut être séquestrée dans la paroi vasculaire. Une multitude de tissus expriment les ARNm de l'angiotensinogène, de la rénine et de l'ECA tels que le cerveau, les reins, le placenta, les vaisseaux et le cœur (de Gasparo et al, 2000)

L'importance du SRAA dans la régulation de la fonction rénale, de l'homéostasie et de la pression artérielle a amené plusieurs chercheurs à étudier le SRAA dans des différents modèles animaux ayant des pathologies cardiovasculaires. Chez les rats normotendus Sprague-Dawley, une stimulation prolongée d'Ang-II est associée à une vasoconstriction, une augmentation de la pression sanguine, au relâchement de l'aldostérone, à l'augmentation des effets des catécholamines et à l'hypertrophie vasculaire et myocardique, incluant le remodelage cardiaque suite à un infarctus du myocarde (Iwai et al, 1995). L'expression des ARNm (ARNm) de l'ECA et du AT₁-R est augmentée chez les rats possédant un cœur hypertrophié (Suzuki et al, 1993; Shunkert et al, 1990). Le stress mécanique stimule la sécrétion de l'Ang-II des myocytes et, à son tour, l'Ang-II induit l'hypertrophie des cardiomyocytes par l'AT₁-R (Sadoshima et al, 1993). La liaison de l'Ang-II au récepteur AT₂-R serait responsable des effets anti-hypertrophiques au niveau du système cardiovasculaire (Horiuchi et al, 1999). Le SRAA joue donc un rôle important dans le développement de l'hypertrophie du ventricule gauche (HVG).

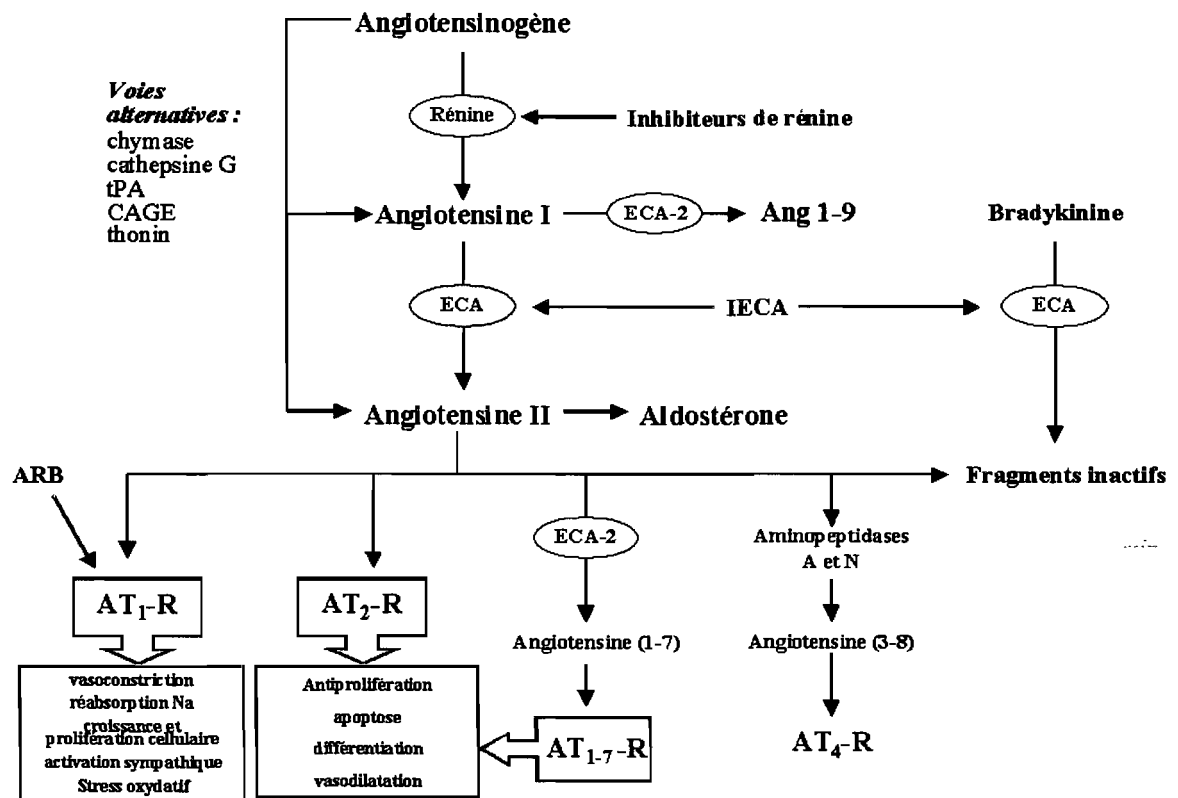


Figure 2. Cascade bioenzymatique du système rénine-angiotensine-aldostérone et les sites d'action des inhibiteurs de rénine, des IECA et des ARB. (Adaptée de Dinh et al, 2001; Lavoie et Sigmund, 2003)

1.1.3 Système nerveux sympathique

Le système nerveux sympathique (SNS) joue un rôle important dans la régulation de la pression sanguine, les processus métaboliques et l'adaptation au stress (Zhu et al, 2005). Dans des conditions normales, le neurotransmetteur norépinéphrine (NE) (Voir Figure 3) est relâché du bouton présynaptique vers la synapse, où il se lie et stimule les

adrénorécepteurs sur les cellules pré- et post-synaptiques (Esler et al, 1985). L'excès de NE est recyclé dans le neurone présynaptique (Meredith et al, 1993).

Des fibres nerveuses motrices du système sympathique innervent les fibres musculaires lisses des vaisseaux sanguins et du cœur (Perry et Illsley, 1986). La NE module une vasoconstriction des vaisseaux, une augmentation de la résistance périphérique et une augmentation de la fréquence cardiaque, tous ces effets menant à une augmentation de la pression artérielle (Vatner et al, 1985; Bevan, 1987; de Champlain et al, 1987). Lorsque le système nerveux sympathique est activé chez une personne normale, l'élévation soudaine de la pression artérielle activera les barorécepteurs cardiaques et vasculaires et provoquera une inhibition de l'activité des fibres du SNS permettant le rétablissement de la pression normale (Guyton et al, 1991). Par contre, il a été démontré, dans des modèles d'hypertension animale, que le SNS est suractivé, provoquant ainsi, non pas une augmentation de la pression artérielle soudaine et réversible, mais bien une augmentation chronique de la pression artérielle (Mancia et al, 1997). L'augmentation de l'activité du SNS augmente la pression sanguine et contribue au développement et au maintien de l'hypertension par la stimulation du cœur, des vaisseaux et des reins causant une augmentation du débit cardiaque, une augmentation de la résistance vasculaire et une rétention d'eau (Mark, 1996).

La technique de microneurographie, utilisée pour la mesure du relâchement de NE aux organes, a démontré que la stimulation sympathique au cœur et aux reins est plus grande chez les patients hypertendus que chez les patients normotendus du même âge (Esler, 2000). Dans le cœur, la NE se lie principalement aux récepteurs α_{1B} et β_1 adrénergiques (Caron et Lefkowitz, 1993). Les β_1 adrénergiques représentent près de 75% du nombre total de récepteurs au cœur (Brodde, 1993). Les récepteurs β -adrénergiques sont couplés principalement à la protéine G hétérotrimérique, Gs, pour stimuler l'activité de l'adénylyl cyclase. Cette association génère l'activation du cAMP et de la protéine kinase A (PKA), qui régulent le rythme et la contractilité cardiaque (Bristow et al, 1989).

Des données expérimentales suggèrent plusieurs interactions entre le SNS et l'endothélium vasculaire, qui joue un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire. L'endothéline-1, qui est sécrétée par les cellules endothéliales, est le vasoconstricteur le plus puissant (Wenzel et al, 1999). Il a été démontré que les niveaux plasmatiques de l'endothéline-1 sont augmentés dans plusieurs maladies cardiovasculaires (Omland et al, 1994). L'injection d'endothéline chez les rats mène à une vasoconstriction périphérique, une augmentation de la pression sanguine et une stimulation du SNS (Mosqueda-García et al, 1993). De plus, les drogues qui stimulent l'activité du SNS, comme la nifedipine, augmentent les niveaux d'endothéline plasmatique *in vivo* chez les humains. Par contre, la moxonidine et certains inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA), qui diminuent l'activité du SNS, n'ont pas d'effet sur les niveaux plasmatiques d'endothéline (Wenzel et al, 1998).

Aussi, l'activité sympathique au niveau du rein est plus grande chez les patients hypertendus. En effet, l'infusion d'un agoniste α -adrénergique, la phentolamine, dans l'artère rénale augmente d'avantage le flux sanguin chez les patients hypertendus que chez les patients normotendus, ce qui est en accord avec le rôle fonctionnel de l'activité sympathique sur le contrôle de la résistance vasculaire rénale (Esler et al, 1990). Dans des modèles animaux, la stimulation directe des nerfs rénaux induit la réabsorption tubulaire de l'eau et du sodium, résultant en une expansion du volume intravasculaire et une augmentation de la pression sanguine (Kapusta et al, 1989). De plus, chez les animaux génétiquement hypertendus et chez les animaux où l'hypertension est induite de manière expérimentale, l'activité sympathique au rein est augmentée et la dénervation rénale prévient ou fait régresser l'hypertension dans ces modèles (Thoren et Ricksten, 1979).

La stimulation sympathique chronique induit le remodelage vasculaire et l'hypertrophie cardiaque, par des actions directes et indirectes de la NE sur ses récepteurs ainsi que sur une variété de facteurs trophique, comme sur les facteurs de croissance des fibroblastes et sur le facteur de croissance β transformant (TGF- β) (Brook et Julius, 2000).

Chez les patients hypertendus, l'HVG est associée avec une augmentation de l'activité sympathique au cœur, ce qui suggère que l'augmentation du relâchement de NE au cœur est reliée au développement de l'HVG (Schlaich et al, 2003). À des valeurs de pression sanguine similaires, les patients hypertendus avec une HVG possèdent un taux plus élevé de NE cardiaque que chez les patients hypertendus sans HVG (Grassi, 2004). La masse du ventricule gauche est augmentée chez les patients obèses normotendus et cette augmentation est en corrélation avec l'activité sympathique au cœur (Amador et al, 2004). L'exposition directe à la NE augmente la synthèse protéique dans les cardiomyocytes adultes et néonataux en culture (Calderone et al, 1998). Des études cliniques ont démontré une corrélation positive entre les niveaux de NE circulants, la masse du ventricule gauche et la réduction de la compliance des artères radiales (Marcus et al, 1994; Grassi et al, 1995). Ces résultats impliquent le SNS non seulement dans la pathogénèse de l'hypertension, mais aussi dans le développement de lésions aux organes cibles.

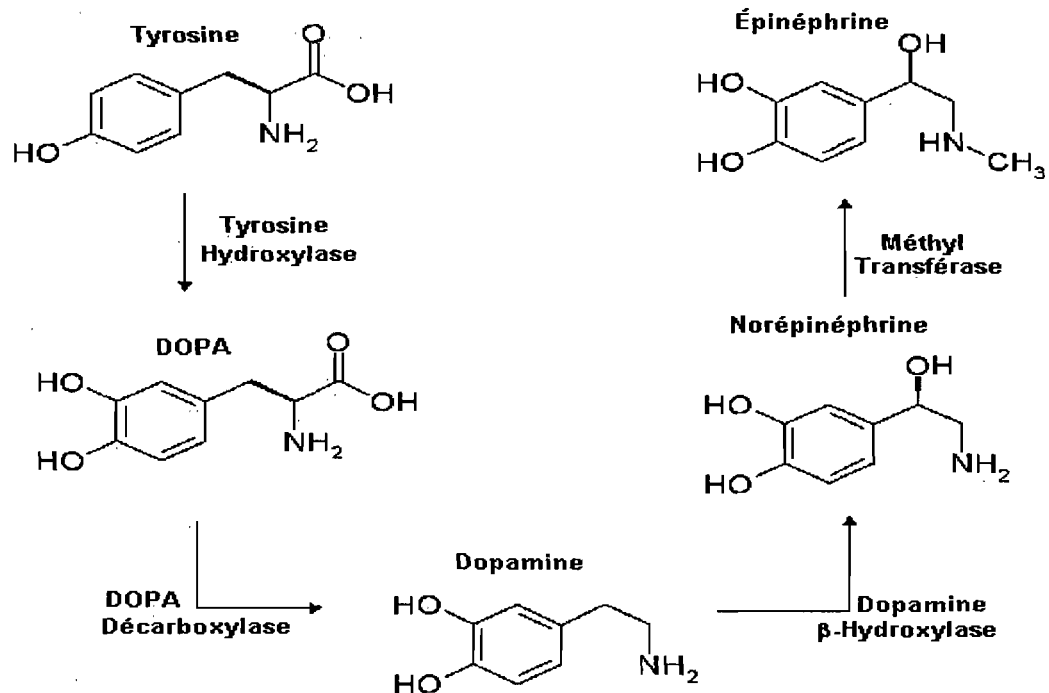


Figure 3. Schéma de la biosynthèse de la norépinéphrine. La tyrosine est transportée dans les nerfs par un système de transport actif, puis elle est hydrolysée en DOPA par la tyrosine hydroxylase, l'étape limitante de la synthèse. La DOPA décarboxylase transforme la DOPA en dopamine, puis la dopamine est prise par des vésicules synaptiques où elle sera transformée en norépinéphrine par la β -hydroxylase. La NE y sera stockée avec de l'ATP jusqu'à un relâchement futur.

1.2 Hypertrophie du ventricule gauche

L'hypertension est la cause la plus commune de la surcharge de pression et de la surcharge mécanique du ventricule gauche. L'augmentation de la résistance à l'éjection systolique entraîne ainsi une augmentation de la pression systolique au niveau du ventricule gauche (Otero et al, 1997). Pour pouvoir diminuer la pression au ventricule, le cœur doit expulser davantage de sang durant sa contraction. Pour se faire, les cardiomyocytes, les cellules musculaires du cœur, du ventricule gauche augmenteront de taille et le contenu en

collagène de la paroi ventriculaire augmentera (Aiello et al, 2004). Ces changements amèneront à un épaississement concentrique de la paroi du septum ventriculaire, connu sous le nom hypertrophie du ventricule gauche. L'HVG permet de réduire la tension pariétale du ventricule gauche et de maintenir la fonction systolique. L'hypertrophie du tissu myocardique est un important mécanisme compensatoire contre l'augmentation de la pression ou du volume imposé au cœur puisqu'elle permet, à court terme, de faire les ajustements mécaniques nécessaires pour surmonter la charge supplémentaire (Frey et al, 2004). Par contre, des études récentes ont démontré que l'HVG est un processus inadapté, associé avec l'augmentation des risques de maladies cardiovasculaires. Cette hypertrophie est accompagnée par des modifications structurelles du muscle cardiaque, des altérations dans l'expression des gènes, la perte de cardiomyocytes, un développement vasculaire déficient et une fibrose (Fortuño et al, 2001). Donc, à plus long terme, la réponse compensatoire est suivie par la transition vers l'insuffisance cardiaque et la dysfonction contractile.

1.2.1 Hypertrophie des cardiomyocytes

L'hypertrophie des cardiomyocytes est une adaptation du cœur pour atténuer le stress systolique sur le ventricule gauche. Comme les cardiomyocytes adultes ne peuvent pas se diviser, leur masse et leur volume augmentent (Wagner et al, 1999). Ils ajoutent des sarcomères en parallèle, ce qui augmente la force de contractilité de chaque cellule (Wakatsuki et al, 2004). L'hypertrophie des cardiomyocytes est une réponse à une déformation mécanique résultant de l'étirement et des forces de cisaillement. En plus du stress mécanique, l'hypertrophie des cardiomyocytes est aussi activée par des seconds messagers, des hormones (endothéline, Ang-II et NE) et des proto-oncogènes impliqués dans la différenciation et la prolifération cellulaire (Fernandez-Alfonso et al, 1992). De plus, l'expression des gènes des cardiomyocytes revient vers le modèle embryonique qui inclut l'expression des chaînes lourdes de la β -myosine, de l' α -actine squelettique et des

peptides natriurétiques, ANP et BNP, ce qui amènera à une augmentation de la quantité des protéines contractiles.

1.2.2 Prolifération des fibroblastes et fibrose

Environ 70% de la masse cardiaque est constituée de cardiomyocytes. Des 30% des cellules restantes, les fibroblastes en représentent 90% (Vliegen et al, 1991). Lors de l'hypertrophie cardiaque, les cardiomyocytes deviennent hypertrophiés sans prolifération alors que les fibroblastes se différencient et se multiplient. Les fibroblastes augmentent en taille et prolifèrent, avec pour conséquence une production excessive de matrice extracellulaire et de collagène, entraînant des lésions irréversibles de fibrose myocardique (Weber et al, 1989). Le développement de la fibrose myocardique distingue l'hypertrophie ventriculaire pathologique de l'hypertrophie physiologique. La fibrose causée par l'hypertension réduit l'organisation tridimensionnelle du muscle cardiaque et augmente la rigidité du myocarde ce qui réduit le remplissage du cœur durant la diastole (Wakatsuki et al, 2004). Les altérations physiologiques qui en résultent incluent un changement du flux sanguin au myocarde, le développement d'arythmies et une dysfonction diastolique (Gradman et Alfayoumi, 2006).

1.2.3 Mort des cardiomyocytes

L'hypertrophie cardiaque tend à progresser vers une fonction cardiaque dépressive, appelée décompensation, puis vers l'insuffisance cardiaque qui est décrite comme une condition dans laquelle le débit cardiaque est insuffisant aux demandes métaboliques de l'organisme (Harris, 1994). Malgré que l'hypertrophie du myocarde soit une condition complexe associée avec plusieurs conséquences indésirables, l'évènement cellulaire irréversible en décompensation est la dégénération et la mort des cardiomyocytes. Il y a trois types de morts cellulaires distincts par leurs mécanismes et pathologies : la nécrose, l'autophagie et l'apoptose (Majno et Joris, 1995).

Traditionnellement, il était pensé que la perte des cardiomyocytes provenait seulement de la nécrose. Plus récemment, certaines études ont démontré que la mort par autophagie des cardiomyocytes est aussi impliquée dans la transition du myocarde hypertrophié vers la décompensation (Hein et al, 2003; Knaapen et al, 2001). Par contre, depuis une dizaine d'années, il y a eu plusieurs observations, autant chez les humains que chez les modèles animaux, qui ont démontré que l'apoptose des cardiomyocytes aurait aussi un rôle majeur dans l'insuffisance cardiaque (Narula et al, 1996; Olivetti et al, 1997), l'infarctus du myocarde (Olivetti et al, 1996) et dans le rejet de la transplantation cardiaque (Koglin et al, 1999). De plus, chez les modèles de rats d'infarctus du myocarde, il a été démontré que deux à quatre heures après une occlusion coronaire, la perte des cardiomyocytes est principalement due à l'apoptose (Kajstura et al, 1996). Également l'excès de NE et d'Ang-II potentialise l'apoptose (Cigola et al, 1997; Communal et al, 1999).

On nomme apoptose, ou mort cellulaire programmée, le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un stimulus. C'est une mort physiologique et elle est différente de la nécrose : elle ne provoque pas d'inflammation, les membranes plasmiques ne sont pas détruites et la cellule émet des signaux qui permettront sa phagocytose par les globules blancs, notamment les macrophages (Freude et al, 1998). La balance entre la mort cellulaire et la survie cellulaire est un processus hautement contrôlé, surtout dans des cellules différenciées et incapables de division, comme les cardiomyocytes.

La perte de cardiomyocytes par apoptose est un facteur important qui contribue au remodelage du myocarde en réponse à une surcharge de pression au cœur. Les facteurs qui peuvent déclencher le mécanisme d'apoptose des cardiomyocytes sont les forces mécaniques, le stress oxydatif, l'hypoxie et un déséquilibre entre les facteurs de croissance et les cytokines (Ang-II) ou les neurotransmetteurs (NE) (van Empel et de Windt, 2004). Il a été démontré que les signaux apoptotiques produisent une augmentation

de la taille des cardiomyocytes. Il a été proposé que lorsque les signaux de croissance persistent de manière chronique dans des cellules incapables de se diviser, ils produisent une demande génétique contradictoire et déclenchent une réponse apoptotique (Hamet et al, 1995). Les signaux de croissance persistants pourraient conduire les cardiomyocytes hypertrophiés à perdre les signaux de survie qui suppriment normalement le développement du processus apoptotique.

1.2.4 Protéines impliquées dans l'apoptose

Les interactions entre les multiples molécules pro- et anti-apoptotiques sont complexes. L'apoptose peut être initiée par la mitochondrie, qui relâche le cytochrome c dans le cytosol, en réponse à un stimulus extrinsèque. Aussi, la voie de signalisation apoptotique peut être initiée de manière endogène par les récepteurs de la mort (Kang et Izumo, 2003). Ces signaux mènent à une voie de signalisation qui induit le suicide cellulaire spécifique et coordonné. Ensuite, les deux voies convergent en une voie qui transmet les altérations morphologiques et biochimique finales qui caractérisent l'apoptose (Voir Figure 3).

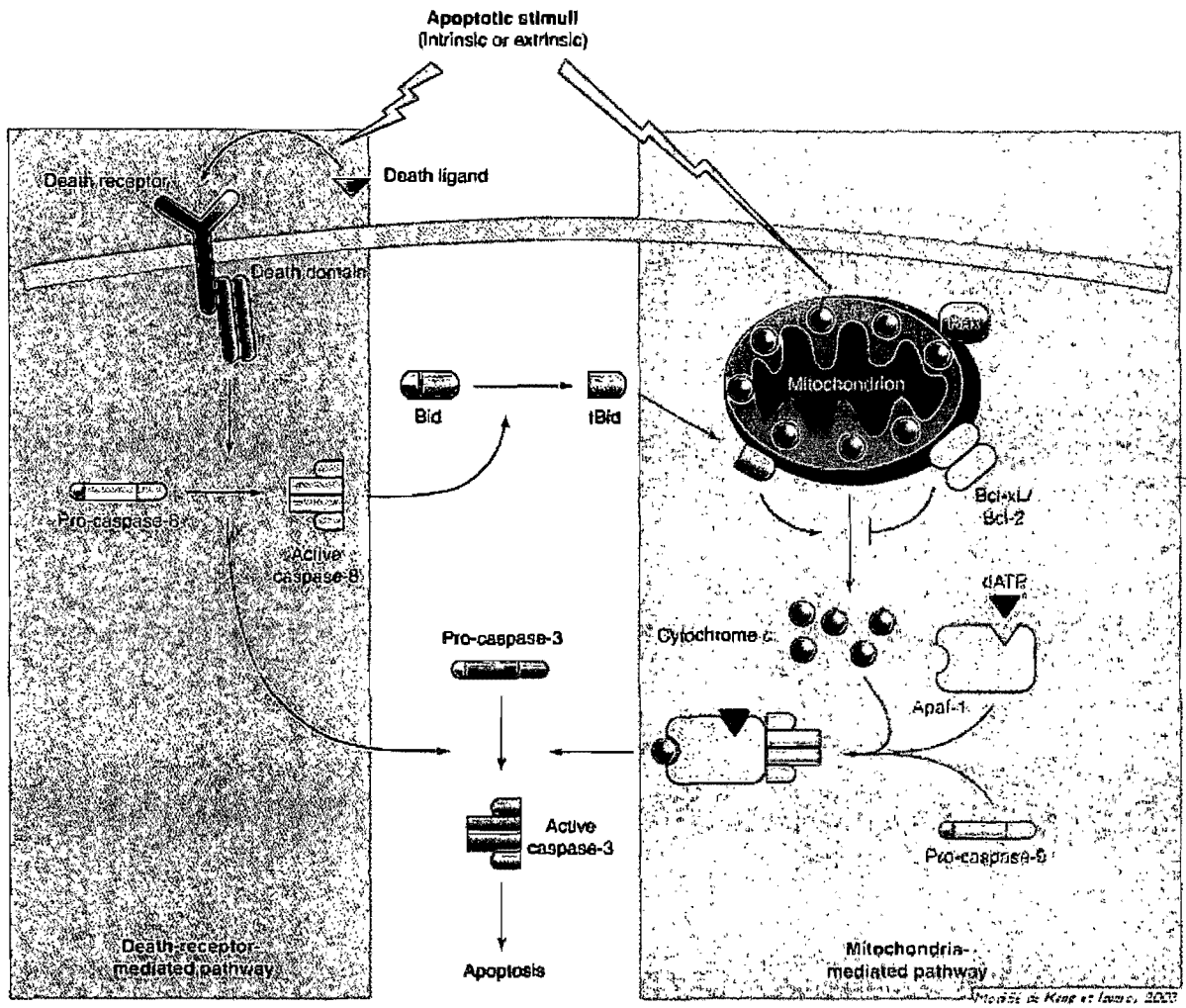


Figure 4. Voies de signalisation de l'apoptose. L'apoptose peut être induite par la mitochondrie (bleu), par une signalisation initiée par le relâchement du cytochrome c dans le cytosol. Il peut y avoir inhibition du relâchement du cytochrome c par les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, tels que Bcl-2 et Bcl-XL. Le cytochrome c relâché forme une complexe d'activation avec Apaf-1 et la caspase-9, menant à l'autoactivation de la caspase-9 et l'activation des caspases effectrices. L'apoptose peut aussi être initiée par le récepteur de la mort (rouge) suite à la liaison de son ligand, FasL. Il s'en suit le recrutement du domaine FADD (Fas-associated death domain), puis l'activation de la caspase-8 et des caspases effectrices. Les voies intrinsèques et extrinsèques convergent vers les caspases effectrices, telle que la caspase-3 (Kang et Izumo, 2003).

1.2.4.1 Les caspases

Les caspases sont un groupe de protéases à cystéine qui jouent un rôle crucial dans l'initiation et l'exécution de l'apoptose. Une quinzaine de ces caspases ont été identifiées dans les cellules des mammifères et elles peuvent être regroupées en deux catégories selon leurs structures et fonctions (Thornberry et Lazebnik, 1998; Reed, 2000). Les caspases initiatrices, telles que les caspases-8 et -9, sont constituées d'un pro-domaine long et fonctionnel qui sera clivé lors de leur activation. Ces caspases initiatrices agissent au début de la cascade et elles initient et régulent l'apoptose. L'autre type de caspases présentes chez les mammifères sont les caspases effectrices. Ce type de caspases, telles que les caspases-3, -6 et -7, sont constituées d'un pro-domaine court et elles agissent vers la fin de la cascade lorsque les deux voies de signalisation (extrinsèque et intrinsèque) se rejoignent. Ces caspases entraînent les changements biochimiques finaux qui caractérisent l'apoptose (Chang et Yang, 2000). En plus des voies de signalisation intrinsèques et extrinsèques, il existe d'autres voies de signalisation impliquées, car l'apoptose est toujours présente chez des souris dont les gènes de la caspase-8 (cruciale pour la voie intrinsèque) et la caspase-9 (cruciale pour la voie mitochondriale) ont été désactivés (Wang et Lenardo, 2000). Cette autre voie de signalisation serait initiée par la caspase-12 et spécifiquement activée par le stress au réticulum endoplasmique (Hitomi et al, 2004).

Un choix logique pour réduire l'apoptose des cardiomyocytes serait de viser ces caspase effectrices. L'inhibiteur de caspase ZVADfmk réduit l'apoptose et la taille de l'infarctus dans un modèle de rat d'ischémie/reperfusion (Yaoita et al, 1998). De plus, il a été démontré que la réduction de l'apoptose des cardiomyocytes par un inhibiteur de caspase entraîne une amélioration de la fonction cardiaque et de la survie chez les souris $G\alpha_q$, un modèle de souris transgénique possédant une cardiomyopathie peripartum accompagnée d'apoptose (Hayakawa et al, 2003).

1.2.4.2 Les protéines de la famille de Bcl-2

La voie de signalisation qui est transmise par la mitochondrie est modulée par les protéines de la famille de Bcl-2 (B-cell lymphoma 2). Plus de 18 membres de la famille de Bcl-2 ont été identifiés et ils sont séparés en deux groupes. La membrane mitochondriale est stabilisée ou déstabilisée par les membres de cette famille. Ils peuvent être soit pro-apoptotiques (Bax, Bad et Bak), soit anti-apoptotiques (Bcl-XL et Bcl-2) selon qu'ils favorisent ou non le relâchement du cytochrome c par la mitochondrie (Youle et Strasser, 2008). Il a été démontré que l'activation des protéines de la voie mitochondriale est impliquée dans plusieurs modèles d'apoptose au cœur (Gustafsson et al, 2004)

1.2.4.2.1 Bax

La protéine X associée à Bcl-2 (Bcl-2-associated X protein), Bax, a été la première protéine pro-apoptotique identifiée de la famille de Bcl-2. La protéine Bax est en majorité localisée au cytosol et, lors de l'initiation du signal apoptotique, Bax opère un changement conformationnel et se lie à la membrane extérieure de la mitochondrie (Antignani et Youle, 2006). Bax interagit ensuite avec un canal à anion dépendant du voltage de la mitochondrie et il induit son ouverture. La perte du potentiel de la membrane de la mitochondrie qui s'en suit provoque le relâchement du cytochrome c et d'autres facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie vers le cytosol, menant à l'activation des caspases (Er et al, 2006).

1.2.4.2.2 Bcl-2

La protéine Bcl-2 est la protéine mitochondriale la mieux caractérisée des protéines anti-apoptotiques. Bcl-2 se situe principalement sur la membrane externe de la mitochondrie, mais aussi sur le réticulum endoplasmique et sur la membrane nucléaire (Krajewski et al, 1993). En plus de sa fonction de prévention du relâchement du cytochrome c de la mitochondrie (Nguyen et al, 1994), Bcl-2 protégerait la cellule contre l'apoptose même à la suite de l'induction du relâchement du cytochrome c par Bax (Rossé

et al, 1998). La surexpression de Bcl-2 est cytoprotective en prévenant la perte du potentiel électrique de la membrane et le relâchement des protéines intermembranaires (Adams et Cory, 2001). La surexpression de Bcl-2 atténue l'apoptose induite par p53, un facteur de transcription activé en réponse au dommage à l'ADN (Ryan et al, 2001), et protège contre l'apoptose induite par l'ischémie/reperfusion des cardiomyocytes *in vitro* et *in vivo* (Chen et al, 2001; Kang et al, 2000).

1.3 Modèles animaux de l'hypertension artérielle

Plusieurs modèles animaux de l'hypertension artérielle ont été développés pour pouvoir étudier cette maladie. Le rat spontanément hypertendu (SHR) est le modèle le plus utilisé, car il reflète une hypertension essentielle de cause génétique, tout comme chez l'humain où l'hypertension essentielle implique plusieurs aspects génétiques. Plusieurs autres aspects de l'étiologie de l'hypertension sont étudiés dans d'autres modèles animaux, dont certains sont décrits ci-dessous.

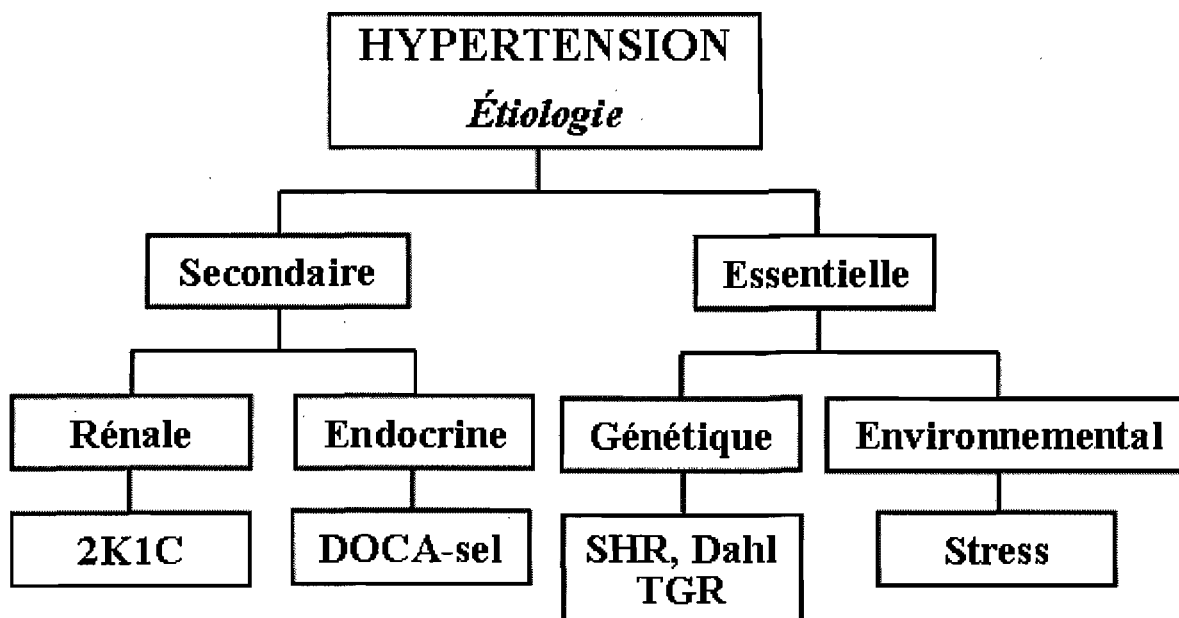


Figure 5. Étiologie des modèles de rats en hypertension (Adaptée de Pinto et al, 1998)

1.3.1 SHR

Les SHR développent spontanément une HTA sévère entre la 5ème et la 15ème semaine d'âge avec une pression artérielle systolique atteignant les 200 mmHg. Cette souche de rat a été sélectionnée par Okamoto et Aoki dans les années 60, à partir de deux rats Wistar de leur élevage, situé à Kyoto, qui présentaient une pression artérielle relativement élevée (Okamoto et Aoki, 1963). Le fait de parvenir à générer une telle souche hypertendue uniquement par reproduction démontre l'extrême importance des facteurs génétiques dans la transmission de cette pathologie.

Le rein joue un rôle important dans le développement de l'hypertension chez le SHR. Il a été démontré qu'il y a augmentation de la pression sanguine chez un rat normotendu Wistar-Kyoto (WKY) lorsque celui-ci reçoit un rein de SHR par transplantation. À l'inverse, il y a normalisation de la pression sanguine chez le SHR qui reçoit un rein de WKY par transplantation (Kawabe et al, 1978). Ces observations sont les

mêmes si la transplantation a lieu chez les SHR de jeune âge, avant même que l'hypertension soit établie (Patschan et al, 1997).

Des anomalies au rein qui entraîneraient une réabsorption accrue du sodium ou une incapacité à excréter normalement le sodium seraient les principales causes de l'installation de l'hypertension chez le SHR (de Wardener, 1996). En effet, il a été démontré que la réabsorption du sodium par le tubule proximal (Aldred et al, 2000) et que la résistance vasculaire rénale sont augmentées (Norrelund et al, 1994) chez les SHR. De plus, la relation pression/natriurèse est déplacée vers une pression élevée de perfusion rénale (Roman, 1987). Aussi, dans la phase pré-hypertensive (5ème à la 8ème semaine), le SHR présente une augmentation de l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase entraînant une augmentation de la réabsorption du sodium (Hinojos et Doris, 2004). Des facteurs neurogéniques contribuent également à la résistance vasculaire élevée du SHR (Yamori, 1976).

Tout comme chez les humains, où il a été démontré que la stimulation du système nerveux sympathique est impliquée dans l'initiation et dans le développement de l'hypertension, les SHR présentent une hyperactivité sympathique (Judy et al, 1976) et une hyperexcitabilité sympathique (McCarty et al, 1978). De plus, la concentration plasmatique de NE chez les SHR est plus élevée que chez les rats normotendus (Howe et al, 1979). Les rats SHR *stroke prone* (SHR-SP) sont une sous-lignée des SHR ayant des niveaux encore plus élevés de pression sanguine et une forte tendance à mourir d'accidents vasculaires cérébraux (Richer et al, 1997).

1.3.2 Rats Dahl sensibles au sel

Les rats sensibles au sel développent une hypertension sévère et fatale lorsque nourris avec une diète riche en sel. Lorsque ces rats sont nourris avec une diète normale, les rats sensibles au sel développent l'hypertension, démontrant que c'est un modèle d'hypertension génétique, comprenant un facteur de sensibilité au sel (Rapp, 1982). Il a été

démontré que certains gènes situés sur le même locus que les gènes de l'ECA et du récepteur de l'ANP étaient altérés dans ce modèle de rat (Deng et Rapp, 1992).

Les rats Dahl, qui lorsque nourris avec des diètes normales en sel présentent une hypertension modérée, voient leur pression sanguine augmentée largement lorsque nourris avec une diète riche en sel, dépassant même les valeurs de pression sanguine des SHR (Schleiffer et Gairard, 1995). Leur hypertrophie cardiaque est comparable aux SHR, mais les rats Dahl développent une insuffisance cardiaque plus rapidement (4-5 mois vs 18 mois) (Inoko et al, 1994). De plus, les atteintes rénales sont plus sévères que dans les SHR, avec une protéinurie sévère et rapide.

Leur pression sanguine répond à l'inhibition du SRAA, aux diurétiques, aux vasodilatateurs et aux antagonistes du récepteur à l'endothéline. Par contre, les bloqueurs de canaux calciques et les β -bloqueurs sont moins efficaces.

1.3.3 Rats TGR(mREN2)27

L'introduction et la surexpression du gène Ren-2 de la souris chez ces rats induit, chez les rats homozygotes pour le transgène, une hypertension sévère et létale s'ils ne sont pas traités avec des IECA. Ces rats expriment fortement le transgène Ren-2 dans plusieurs tissus extrarénaux et l'expression de leur rénine endogène est supprimée (Bader et al, 1992). La rénine active de souris réagit avec l'angiotensinogène endogène du rat pour induire une hypertension par le SRAA (Langheinrich et al, 1996). Par contre, il a été démontré que les niveaux d'Ang-II dans les reins et le plasma ne sont pas élevés durant les phases de développement de l'hypertension chez ces rats (Mitchell et al, 1997). Donc, le développement de l'hypertension ne peut pas provenir seulement de l'augmentation de la production de l'Ang-II et proviendrait aussi d'une réponse rénale augmentée face à l'Ang-II (Jacinto et al, 1999).

L'inhibition du SRAA réduit de façon efficace la pression sanguine et atténue le développement de l'hypertrophie cardiaque. Les vasodilatateurs et les β -bloqueurs font diminuer la pression sanguine, sans pour autant la normaliser (Teisman et al, 1998).

Ce modèle est utilisé pour l'étude de l'hypertension de diverses conditions reliées à l'activation du SRAA, de l'angiogénèse, de l'activation des cytokines et des états pathologiques inflammatoires et profibrotiques.

1.3.4 Rats *two-kidney one-clip*

Dans le modèle de rats *two-kidney one-clip* (2K1C), le flux sanguin est réduit dans un des reins de manière mécanique, le rendant ainsi ischémique. L'autre rein est laissé intact, ce qui cause une augmentation des forces de cisaillement au niveau de la vasculature. La conséquence sera une augmentation des niveaux de rénine et d'Ang-II circulants et l'activation du système endothéline (Koletsky et al, 1971). L'hypertension résultant de la réduction du flux sanguin à un rein provient de l'augmentation de l'activité du SRAA (Brunner et al, 1971).

La technique utilisée pour réduire le flux sanguin au rein varie beaucoup entre les études, particulièrement en ce qui attrait à la taille du clip et à l'âge des rats utilisés. Les valeurs de la pression sanguine et de l'hypertrophie cardiaque sont donc différentes d'une étude à l'autre, variant entre 25 et 50% (Pinto et al, 1998).

La pression sanguine et l'hypertrophie cardiaque chez les rats 2K1C sont très sensibles aux médicaments qui inhibent le SRAA (Chan et al, 1984). Elles répondent aussi aux bloqueurs des canaux calciques et les vasodilatateurs, mais pas aux diurétiques et au β -bloqueurs, donnant aux rats 2K1C un profil similaire au SHR (Lee et al, 2006; Wang et al, 1992).

1.3.5 Rats DOCA-sel

L'hypertension chez les rats DOCA-sel est induite par l'administration de déoxycorticosterone acétate, en combinaison avec une diète riche en sel et une néphrectomie unilatérale. Cette forme d'hypertension secondaire est caractérisée par des niveaux faibles en rénine, ce qui est à l'opposé des 2K1C où la rénine est augmentée (Gomez-Sanchez et al, 1996). L'administration de DOCA et d'une diète riche en sel entraîne aussi une hypertrophie cardiaque et de la fibrose cardiaque (Brilla et Weber, 1992). Le DOCA, la forme soluble de la déoxycorticosterone, est le précurseur de l'aldostérone (Jacob et al, 2005). La déoxycorticosterone et l'aldostérone lient le récepteur à minéralocorticoïdes présents dans le tubule rénal, entraînant une augmentation de la synthèse des canaux sodiques de l'épithélium ce qui causera une rétention du sodium par une augmentation du flux transépithélial sodique du tubule vers le sang (Fuller and Young, 2005).

Dans ce modèle, l'inhibition du SRAA ne fait pas diminuer la pression sanguine et les dommages subséquents aux organes (Li et al, 1996). Par contre, les vasodilatateurs directs, les bloqueurs des canaux calciques et les diurétiques abaissent la pression sanguine et l'hypertrophie cardiaque (Li et al, 1996; Cabral et al, 1994; Anderson et al, 1988)

Le choix d'un bon modèle animal pour l'hypertension est dicté par l'objectif expérimental. Pour étudier la morbidité associée avec l'hypertension, il est préférable d'utiliser un modèle dont l'étiologie est connue à un certain degré (2K1C, DOCA-sel et TGR(mRen2)27). Les modèles avec une étiologie inconnue, surtout génétique (SHR, SHR-SP, Dahl) donnent l'opportunité de rechercher de nouveaux mécanismes et de nouveaux gènes en hypertension.

1.4 Traitements de l'hypertension artérielle

Étant donné la complexité de l'hypertension artérielle et son caractère multifactoriel justifie qu'il n'existe pas de traitement unique et universel pour combattre l'hypertension. L'objectif thérapeutique de l'hypertension artérielle est de diminuer la tension artérielle et de prévenir le risque de complications cardiovasculaires. Les traitements avec des drogues antihypertensives ne devraient pas seulement viser une réduction de la pression sanguine, mais devraient aussi empêcher la progression ou, encore mieux, favoriser la régression des altérations fonctionnelles et structurelles cardiovasculaires (Grassi, 2004).

1.4.1 Classes de médicaments

Il existe cinq principales classes de médicaments pour le traitement de l'hypertension : les diurétiques, les vasodilatateurs, les bloqueurs des canaux calciques, les bloqueurs du SRAA et les inhibiteurs du SNS.

1.4.1.1 Les diurétiques

Les diurétiques, particulièrement les thiazides et leurs analogues, exercent un effet hypotenseur graduel et stable. Il a été démontré que les diurétiques préviennent plusieurs complications cardiovasculaires, particulièrement les désordres cérébraux vasculaires. À faible dose, ils sont aussi efficaces que les autres agents antihypertensifs contre presque toutes les complications cardiovasculaires (Psaty et al, 2003).

Les diurétiques sont une classe de médicaments qui augmentent l'élimination urinaire du sodium en inhibant le co-transporteur Na-Cl des cellules du tubule rénal. Le taux de filtration par le glomérule et la charge de sodium étant normaux, l'inhibition de la réabsorption du calcium par le tubule rénal rend la balance du sodium négative. Conséquemment, le volume des fluides du corps et la pression sanguine vont diminuer (Kimura et al, 1996). Une réduction de la pression des capillaires du glomérule qui

accompagne la baisse de pression sanguine réduit le taux de filtration du glomérule et la charge de sodium pour maintenir la balance du sodium. Donc, l'inhibition de la réabsorption tubulaire du sodium requiert une baisse de pression sanguine pour maintenir la balance du sodium (Saito et Kimura, 1996).

L'utilisation unique de diurétiques a diminué beaucoup au cours des dernières années en conséquence avec l'introduction de nouvelles drogues qui sont associées avec moins d'effets secondaires. Par contre, les diurétiques sont de plus en plus utilisés en combinaison avec des bloqueurs de canaux calciques ou des modulateurs du SRAA.

1.4.1.2 Les vasodilatateurs

Les vasodilatateurs directs, comme l'hydralazine ou la minoxidil, sont généralement utilisés en réserve pour les patients avec une hypertension avancée sur laquelle les traitements conventionnels sont inefficaces.

Les vasodilatateurs directs agissent en ouvrant les canaux potassiques sensibles à l'ATP dans les cellules des muscles lisses vasculaires. L'ouverture des canaux potassiques d'une cellule mène à l'hyperpolarisation dans les cellules possédant des canaux calciques voltage-dépendant, comme les cellules des muscles lisses vasculaires. L'hyperpolarisation prévient l'ouverture des canaux calciques et, donc, l'excitation de celles-ci (Quast, 1992). De plus, l'hyperpolarisation inhibe la production d'inositol triphosphate et le relâchement de calcium intracellulaire du réticulum endoplasmique (Yanagisawa et al, 1993). Les vasodilatateurs directs diminuent la pression sanguine par une relaxation des muscles lisses vasculaires entraînant donc une diminution de la résistance périphérique.

La vasodilatation des artérioles peut stimuler le SNS périphérique par les réflexes des barorécepteurs de l'aorte et la carotide. L'activation subséquente du SNS entraîne une augmentation du rythme cardiaque, du relâchement de la rénine et de la rétention du

sodium (Pettinger et Mitchell, 1988). C'est pourquoi les vasodilatateurs directs sont souvent utilisés avec un diurétique et un β -bloqueur.

1.4.1.3 Les bloqueurs des canaux calciques

La plupart des bloqueurs des canaux calciques ont un effet inotropique négatif, c'est-à-dire qu'ils diminuent la force de contraction des muscles du cœur. Les bloqueurs des canaux calciques bloquent les canaux calciques voltage dépendants de type-L dans le cœur et les vaisseaux (Yedinak, 1993). Ce blocage prévient, en partie, l'augmentation des niveaux de calcium des cellules lorsqu'elles sont stimulées, ce qui entraîne une contraction plus faible. La plupart des bloqueurs des canaux calciques ralentissent aussi la conduction de l'activité électrique dans le cœur, en bloquant les canaux calciques durant la phase du plateau du potentiel d'action du cœur. Cet effet est dit dromotrope, c'est-à-dire qu'il cause une baisse du rythme cardiaque (Ikodomidis et al, 1990).

Tous ces effets réduisent la résistance totale périphérique en dilatant les vaisseaux sanguins et réduisent le débit cardiaque en abaissant la force de contraction. Puisque la résistance et le débit diminuent, la pression est diminuée.

1.4.1.4 Les ARB, les IECA et les inhibiteurs de rénine

Les bloqueurs des AT_1 -R (ARB), les IECA et les inhibiteurs de la rénine visent tous l'inhibition du système rénine-angiotensine-aldostérone (voir Figure 2).

Les ARB bloquent spécifiquement la liaison de l'Ang-II aux AT_1 -R. Le blocage du AT_1 -R réduit les effets hémodynamiques délétères spécifique à sa liaison par l'Ang-II (Finnegan et Gleason, 2003). De plus, l'augmentation de la disponibilité de l'Ang-II par le blocage des AT_1 -R induit une augmentation des effets potentiellement bénéfiques par la stimulation accrue de l' AT_2 -R (Martin et Krum, 2002). Quant aux IECA, ils améliorent la balance vasoconstriction/vasodilatation par l'inhibition de l'ECA, ce qui entraîne

l'inhibition de la formation d'Ang-II et la prévention de la dégradation de la bradykinine (Witherow et al, 2001).

Théoriquement, les ARB seraient de meilleurs inhibiteurs du SRAA que les IECA. L'utilisation des IECA entraîne quand même une génération d'Ang-II par des mécanismes indépendant de l'ECA (Arakawa, 1996). Aussi, l'utilisation d'un ARB, en plus de bloquer les effets néfastes de l'Ang-II sur les AT1-R, entraîne la stimulation de l'AT2-R et entraîne ainsi des actions cardiovasculaires bénéfiques additionnelles (Martin et Krum, 2002). Par contre, les effets bénéfiques de la réduction de la dégradation de la bradykinine contribue à l'efficacité des IECA.

Malgré ces considérations théoriques, il a été démontré que les ARB possèdent une efficacité anti-hypertensive similaire aux IECA. En effet, une étude a démontré que l'utilisation de 80 mg de valsartan (ARB) est aussi efficace que 20 mg d'énalapril (IECA), à court et long terme, dans le traitement de patients avec une hypertension modérée (Mallion et al, 1997). Une autre étude a démontré que la combinaison de l'énalapril et du losartan (ARB) entraîne significativement une plus grande réduction de la pression sanguine systolique que le traitement seul avec l'une ou l'autre de ces drogues (Azizi et al, 2000).

En plus de leurs effets antihypertensifs, les traitements aux IECA et ARB entraînent une régression de l'HVG (Ishimitsu et al, 2005; Peng et al, 2005; Yasunari et al, 2005). La régression de l'HVG par les IECA et ARB chez les SHR implique une réduction de la masse des cardiomyocytes, une réduction de l'hyperplasie des fibroblastes et une baisse du contenu en collagène (Der Sarkissian et al, 2003; Varo et al, 1999). La régression de l'HVG par les IECA et les ARB est aussi associée à une augmentation de la fragmentation de l'ADN (un marqueur de l'apoptose) et à une réduction de la synthèse de l'ADN au cœur (Tea et al, 1999).

Plusieurs études démontrent donc que l'inhibition du SRAA par les IECA et les ARB est bénéfique pour le système cardiovasculaire par une réduction de la pression artérielle et de l'hypertrophie cardiaque. Par contre, l'inhibition complète du SRAA n'est pas possible (Azizi et Ménard, 2004), car la réduction de la stimulation du AT₁-R entraîne une baisse de la rétroaction négative, amenant à une augmentation compensatoire du relâchement et donc de l'activité de la rénine plasmatique (Bing, 1973).

Puisque la conversion de l'angiotensinogène en Ang-I est l'étape limitante de la production d'Ang-II, le concept de l'inhibition du RAAS à ses origines par un inhibiteur de rénine n'est pas récent. Plusieurs inhibiteurs directs de la rénine ont été synthétisés, mais rapidement abandonnés parce qu'ils possédaient une puissance trop faible, une faible biodisponibilité et une courte demi-vie (Neisius et al, 1986; Camenzind et al, 1991)

L'aliskiren est le premier d'une nouvelle classe d'inhibiteur de rénine hautement spécifique. Des études chez les ouistitis et les rats ont démontré que l'aliskiren réduit la pression sanguine d'une manière dose-dépendante et très efficace pour bloquer l'activité de la rénine plasmatique tout en réduisant parallèlement les autres constituants en aval du SRAA (Pool et al, 2005). Des études cliniques ont confirmé que la baisse de la pression sanguine par l'aliskiren est similaire ou meilleure que les doses standards des IECA et des ARB (Azizi et al, 2004). Des études cliniques en phase III sont présentement effectuées pour déterminer si la suppression du SRAA par l'aliskiren entraîne des effets bénéfiques sur l'HVG et l'insuffisance cardiaque (Staessen et al, 2006).

1.4.1.5 Les inhibiteurs du système nerveux sympathique

Le système nerveux sympathique est la plus importante voie effectrice dans la régulation de la pression sanguine (Folkow, 1989). Une grande majorité des fibres sympathiques sont vasoconstrictrices et la NE est le principal neurotransmetteur

périphérique dans les parois vasculaires. Plusieurs médicaments antihypertensifs réduisent la pression sanguine par l'inhibition du SNS périphérique, en inhibant l'action de la NE par le blocage des récepteurs α -1 et β -adrénergiques. En bloquant les récepteurs α -1 dans les vaisseaux, on obtient une diminution de la vasoconstriction (Chen et Minneman, 2005). Le blocage des récepteurs β -adrénergiques du coeur mène à une baisse de la force de contraction et de la fréquence cardiaque (Shin et Johnson, 2007). Le blocage de ces récepteurs dans le rein mène à une réduction du relâchement de la rénine et de l'Ang-II et, par conséquent, une baisse de la rétention de sodium (de Leeuw et al, 1988). Aussi, la pression sanguine peut être réduite par l'inhibition du relâchement de la NE en activant les récepteurs α -2 adrénergiques dans le SNC (α -méthyl-dopa) ou en activant les récepteurs aux imidazolines, avec des agonistes qui ont une affinité plus faible pour les récepteurs α -2 adrénergiques, tels que la clonidine (1:1), la rilmenidine (3 :1) et la moxonidine (30:1).

La moxonidine, principalement par son action centrale sur les récepteurs aux imidazolines du RVLM, inhibe l'activité sympathique périphérique (Ernsberger et al, 1996). La réduction de la pression sanguine provient de l'inhibition de l'activité sympathique périphérique aux vaisseaux par une réduction de la résistance périphérique vasculaire (Prichard et Graham, 1997). Aussi, l'inhibition de l'activité sympathique aux reins entraîne une diurèse et une natriurèse par la suppression de la réabsorption tubulaire de sodium (Menegaz et al, 2001).

Notre laboratoire a démontré que l'activation des récepteurs aux imidazolines *in vivo* par des injections aiguë de moxonidine chez les SHR est associée d'une manière dose-dépendante avec une natriurèse, une diurèse et une kaliurèse, en plus stimuler les niveaux plasmatiques d'ANP et l'excrétion urinaire de cGMP, impliquant donc l'ANP dans les actions rénales de la moxonidine (Mukaddam-Daher et Gutkowska, 2000). L'activation chronique des récepteurs aux imidazolines par un traitement d'un mois avec la moxonidine chez les SHR réduit la pression sanguine et diminue l'hypertrophie cardiaque, en plus de faire augmenter les niveaux plasmatiques d'ANP et de BNP (Menaouar et al, 2002). Nous

avons aussi démontré que la perfusion des coeurs *ex vivo* avec la moxonidine stimule le relâchement de l'ANP et, donc, que ce relâchement provient de l'action de la moxonidine directement sur les récepteurs aux imidazolines présents au coeur sans la contribution du SNC (Mukaddam-Daher et al, 2006).

1.4.1.5.1 Récepteurs aux imidazolines

Il existe trois classes de récepteurs aux imidazolines : les I_1 transmettent les actions sympatho-inhibitrices pour réduire la pression sanguine, les I_2 sont un site de liaison allostérique de la monoamine oxydase et les I_3 régulent la sécrétion de l'insuline par les cellules pancréatiques de type β (Bousquet et al, 1998). Des études récentes ont démontré que les I_1 et I_2 jouent aussi un rôle dans la prolifération cellulaire, la régulation du gras corporel, la neuroprotection, l'inflammation et dans quelques désordres psychiatriques comme la dépression (Head et Mayorov, 2006)

Les I_1 ont au moins un ligand endogène, identifié comme étant l'agmatine (Li et al, 1994). L'agmatine est présent dans plusieurs tissus, incluant le coeur. Les I_1 sont présents dans le SNC, incluant la médulla rostro-ventro-latérale du bulbe rachidien (RVLM, une aire importante du contrôle du SNS), les reins, le pancréas, l'estomac et les plaquettes (Ernsberger, 2000; Pinthong et al, 2004).

Notre laboratoire a démontré la présence des récepteurs aux imidazolines au coeur, à la suite d'études de liaison membranaire et d'autoradiographies, et que les récepteurs aux imidazolines sont surexprimés en hypertension et en insuffisance cardiaque, suggérant leur implication dans la régulation cardiovasculaire (El-Ayoubi et al, 2002). Aussi, nous avons démontré que les récepteurs aux imidazolines du coeur sont normalisés à la suite du traitement à la moxonidine pendant un mois chez les SHR (El-Ayoubi et al, 2004).

Un candidat pour le I_1 a été cloné (IRAS, *Imidazoline Receptor Antisera-Selected*) et cette protéine a comme homologue chez la souris la protéine Nischarin (Voir Figure 7),

une protéine qui interagit avec la sous-unité α_5 de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ du récepteur de la fibronectine et qui inhibe la migration cellulaire (Alahari et al, 2000).

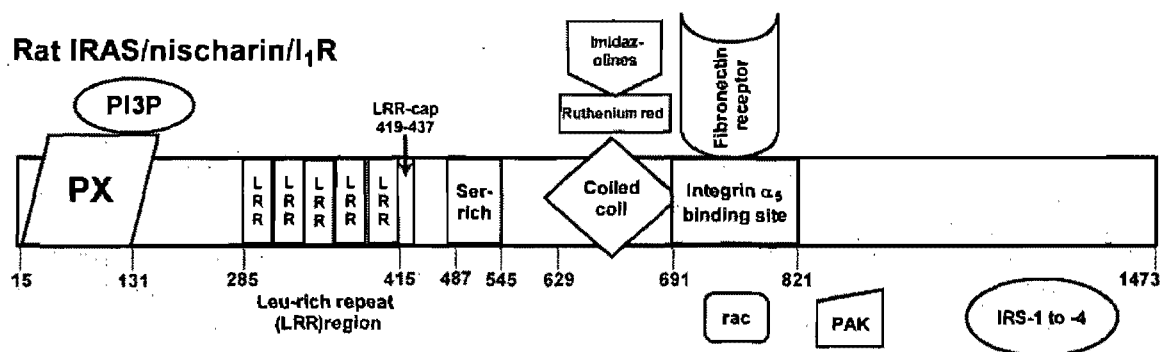


Figure 6. Domaines et motifs majeurs de la protéine IRAS/Nischarin (Sun et al, 2007)

La signalisation des I₁ n'est pas similaire aux voies de signalisation conventionnelles des protéines G, telles que la stimulation de l'hydrolyse de l'inositol triphosphate ou l'induction de flux calciques. La signalisation par les I₁ implique l'activation de la phosphatidyl choline-phospholipase C (PC-PLC) et entraîne la production de diglycérides et d'acide arachidonique (Ernsberger, 1999). La cascade implique l'activation de la protéine kinase C et des MAPkinases, ERK et JNK (Edwards et al, 2001)

1.4.2 Effets bénéfiques sur l'hypertrophie

Globalement, l'augmentation chronique de la pression sanguine va se traduire par une hypertrophie du ventricule gauche, puis se développera vers l'insuffisance cardiaque. Une baisse de la pression sanguine pourrait donc faire régresser ou même empêcher le

développement de l'hypertrophie cardiaque puis son développement vers l'insuffisance cardiaque.

Les composés antihypertensifs qui inhibent les actions du SRAA et du SNS ont des effets bénéfiques en plus d'abaisser la pression sanguine. Les bénéfices des IECA et des ARB sur la régression de l'HVG ont été démontrés à plusieurs reprises (Ishimitsu et al, 2005; Peng et al, 2005, Yasunari et al, 2005). Les études EUROPA et PROGRESS ont démontré que l'utilisation de perindopril, un IECA, prévient les maladies cardiaques chez une grande quantité de patients avec des maladies vasculaires, qu'ils soient hypertendus ou non (Ferrari, 2005). Dans l'étude LIFE, les patients recevant le losartan, un ARB, démontrent significativement moins d'hypertrophie du ventricule gauche et ils sont moins enclins à souffrir de complications cardiovasculaires majeures (Devereux et al, 2004).

Les médicaments qui agissent sur le relâchement ou sur l'action de la NE ont des effets similaires (Liao et al, 2004). Le traitement chronique à la moxonidine, un composé sympatholytique et antihypertensif qui se lie préférentiellement aux récepteurs aux imidazolines (Haxhiu et al, 1994), résulte en une diminution de la pression sanguine et une régression de l'HVG chez les patients et les animaux de laboratoire hypertendus (Greenwood et al, 2000; Mall et al, 1991; Messerli, 2000), et prévient l'HVG induite par infarctus du myocarde chez les rats (Van Kerckhoven et al, 2004).

1.5 Objectifs

Des études de télémétrie faites par notre laboratoire ont confirmé que le traitement avec la moxonidine pendant 7 jours réduit significativement la pression sanguine chez les SHR (Menaouar et al, 2002). Cette même étude confirme aussi l'effet anti-hypertrophique du traitement à la moxonidine. Les niveaux plasmatiques et les ARNm de l'ANP et du BNP sont augmentés à la suite du traitement à la moxonidine. Ces peptides natriurétiques, par leurs actions anti-hypertrophiques, anti-prolifératives et anti-inflammatoires (Horio et al, 2000; Cao et Gardner, 1995) pourraient donc contribuer aux actions sympatholitiques et cardioprotectives de l'activation chronique des récepteurs aux imidazolines.

Plusieurs classes de drogues antihypertensives n'ont pas toutes une efficacité égale pour réduire la masse du ventricule gauche, ce qui suggère une régulation indépendante de la pression sanguine (Agabiti-Rosei, 1994). La régulation de la balance croissance/mort cellulaire lors des traitements antihypertensifs n'est pas très bien comprise, surtout durant le processus de la régression de l'hypertrophie cardiaque. Même si plusieurs groupes, dont le nôtre, rapportent une diminution/régression de l'hypertrophie cardiaque suivant le traitement chronique à la moxonidine, les mécanismes impliqués dans ce remodelage ne sont pas encore connus. Puisque l'hypertrophie cardiaque résulte d'un déséquilibre entre la croissance cellulaire et l'apoptose, des études ont donc été réalisées sur la réplication cellulaire et l'apoptose durant la phase précoce de la réduction de la masse cardiaque, chez les SHR, pour déterminer les effets *in vivo* suite au traitement chronique à la moxonidine. De plus, nous avons étudié l'expression de plusieurs protéines clés impliquées dans la régulation des voies apoptotiques.

**2. Article : Control of Left Ventricular Mass by
Moxonidine Involves Reduced DNA Synthesis and
Enhanced DNA Fragmentation.**

Br J Pharmacol. 2008 Feb;153(3):459-67

Control of Left Ventricular Mass by Moxonidine Involves Reduced DNA Synthesis and Enhanced DNA Fragmentation

**Pierre-Alexandre Paquette^a, David Duguay^b, Rouwayda El- Ayoubi^a, Ahmed Menaouar^a,
Bogdan Danalache, Jolanta Gutkowska^a, Denis DeBlois^b, Suhayla Mukaddam-Daher^{a,b*}**

^aLaboratory of Cardiovascular Biochemistry, Centre Hospitalier de L'Université de Montréal

Research Center, Campus Hotel-Dieu and Dept. Medicine, Université de Montréal

and ^bDept. Pharmacology, Université de Montréal,

Montréal (Quebec) Canada

*Corresponding Author: Suhayla Mukaddam-Daher, Ph.D., Laboratory of Cardiovascular
Biochemistry, CHUM Research Center, 3840 St-Urbain Street (7-133), Montreal (Quebec), Canada,

H2W 1T8.

Tel: 514 890-8000, ext: 12757; Fax: 514 412-7152

E-mail: [REDACTED]

Short title: Mechanisms of LVH Prevention by Moxonidine

Br J Pharmacol. 2008 Feb;153(3):459-67

2.1 Abstract

Background and purpose: Left ventricular hypertrophy (LVH) is a maladaptive process associated with increased cardiovascular risk. Regression of LVH is associated with reduced complications of hypertension. Moxonidine is an antihypertensive imidazoline compound that reduces blood pressure primarily by central inhibition of sympathetic outflow and by direct actions on the heart to release atrial natriuretic peptide, a vasodilator and an antihypertrophic cardiac hormone. This study investigated the effect of moxonidine on LVH and the mechanisms involved in this effect.

Experimental approach: Spontaneously hypertensive rats were treated with several doses of moxonidine (s.c.) over 4 weeks. Blood pressure and heart rate were continuously monitored by telemetry. Body weight and water and food intake were measured weekly. Measurements also included left ventricular mass, DNA content, synthesis, fragmentation, and apoptotic/anti-apoptotic pathway proteins.

Key results: The decrease in mean arterial pressure stabilized at ~ -10 mmHg after 1 week of treatment and thereafter. Compared to vehicle-treated rats (100%), left ventricular mass was dose- and time-dependently reduced by treatment. This reduction remained significantly lower after normalizing to body weight. Moxonidine reduced left ventricular DNA content and inhibited DNA synthesis. DNA fragmentation transiently, but significantly increased at 1 week of moxonidine treatment and was paralleled by elevated active caspase-3 protein. The highest dose significantly decreased the apoptotic protein Bax, and all doses stimulated anti-apoptotic Bcl-2 after 4 weeks of treatment.

Conclusions and Implications: These studies implicate the modulation of cardiac DNA dynamics in the control of left ventricular mass by moxonidine in a rat model of hypertension.

2.2 Introduction

Left ventricular hypertrophy (LVH) occurs in response to altered mechanical load, humoral factors or tissue injury. LVH is characterized by a structural rearrangement of components of the normal chamber wall that involves cardiomyocyte hypertrophy, cardiac fibroblast proliferation, and progression of interstitial and perivascular fibrosis, leading to ventricular stiffening, which impedes both cardiac contraction and relaxation. For several years, LVH has been considered as an adaptive process to preserve contractile function when cardiac workload is chronically increased, such as in hypertension, where a positive correlation between LVH and blood pressure is well established. However, recent studies have shown that LVH is a maladaptive process, associated with increased cardiovascular risk. LVH represents an independent risk factor for cardiovascular morbidity and mortality in hypertensive subjects, and regression of cardiovascular hypertrophy is associated with reduced complications of hypertension (Ishimitsu et al, 2005; Okin et al, 2004; Peng et al, 2005; Yasunari et al, 2005).

The mechanisms implicated in development of LVH in hypertension, include stimulated renin-angiotensin-aldosterone (RAAS) and sympathetic nervous systems (SNS). The implication of activated SNS and norepinephrine (NE) release is based on several findings, such as: in hypertensive patients, high sympathetic drive to the heart (Schlaich et al, 2003); for similar blood pressure values, hypertensive patients with LVH display cardiac NE values and sympathetic nerve firing rates significantly greater than those found in individuals with uncomplicated hypertension (Grassi, 2004); left ventricular mass is increased in normotensive obese subjects and correlates with heart sympathetic activity (Amador et al, 2004); direct exposure to norepinephrine increases protein synthesis in cultured adult and neonatal cardiac myocytes (Calderone et al, 1998; Singal et al, 2004).

Antihypertensive compounds that interfere with the actions of RAAS and the sympathetic nervous system have conferred beneficial effects in addition to the lowering of

blood pressure. The benefits of angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi) and angiotensin receptor blockers (ARBs) on regression of LVH have been well established (Ishimitsu et al, 2005; Peng et al, 2005; Yasunari et al, 2005). In the LIFE study, patients on Losartan displayed significantly less hypertrophy and were less likely to suffer a major cardiovascular event. In contrast, persistence of cardiac hypertrophy predicted an adverse outcome. Beneficial effects provided by ARBs are related to blockade of the angiotensin AT1 receptor, in addition to co-stimulation of the angiotensin AT2 receptor and subsequent increase in nitric oxide and bradykinin-like effects. Mechanisms of LVH regression by ACEi and ARBs in SHR include the reduction of cardiomyocyte mass, fibroblast hyperplasia and collagen content (Der Sarkissian et al, 2003; Tea et al, 1999; Varo et al, 1999). Similarly, drugs that interfere with release or action of NE have beneficial effects (Liao et al, 2004). Chronic treatment with moxonidine, a sympatholytic antihypertensive compound that binds preferentially to imidazoline receptors (Haxhiu et al, 1994), results in blood pressure reduction and regression of LVH in hypertensive patients and laboratory animals (Greenwood et al, 2000; Mall et al, 1991; Menaouar et al, 2002; Messerli, 2000), and prevents MI-induced LV hypertrophy in rats (Van Kerckhoven et al, 2004). However, the mechanisms implicated in LVH regression by moxonidine have not been investigated. Because cardiac hypertrophy is the net product of cell growth and apoptosis, a gene-regulated process of physiological cell self-destruction, these studies were performed to investigate in SHR, the temporal and dose-dependent effect of chronic *in vivo* moxonidine treatment on left ventricular DNA synthesis and fragmentation, as well as on several regulatory proteins in the apoptotic pathway.

2.3 Methods

Spontaneously Hypertensive Rats (SHR, 12–13 weeks old) with established hypertension were purchased from Charles River (St. Constant, QC). Animals were housed

in temperature and light controlled room with food and water *ad libitum*, and maintained for at least 3 days before experimentation. Experiments were performed following the approval of the Bioethics Committee of CHUM, according to the Canadian Guidelines.

Alzet osmotic minipumps (2ML1, 2ML2, 2ML4, Alzet Corp.) were implanted subcutaneously in SHR, under isoflurane anesthesia, as we have previously described (Menaouar et al, 2002). These mini-pumps allowed continuous delivery of moxonidine (kindly provided by Solvay Pharmaceuticals, Germany) at concentrations of 0, 50, 100, 200 & 400 $\mu\text{g kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ for different time points during 4 weeks. The solution of moxonidine was prepared by dissolving the drug in isotonic saline, pH<6.5, then pH adjusted to 7.0-7.4 by NaOH.

Rats were euthanized after 1, 2, and 4 weeks of moxonidine or saline-vehicle treatment. Hearts were quickly isolated, left ventricles were separated and weighed, then snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

In another group, blood pressures (systolic, diastolic and mean arterial pressures), heart rate and animal activity were continuously measured by telemetry (Data Sciences International, St. Paul, MN) as we have previously described (Menaouar et al, 2002) for 2 days before and one month after treatment. The rats were allowed to recover for at least 10 days before implantation of the osmotic minipumps.

DNA extraction and content

Left ventricles of each group were homogenized in liquid nitrogen using a mortar and pestle, and aliquots of 50 mg were weighed and used for quantification of content, fragmentation and synthesis of DNA. The remaining cardiac tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing.

The aliquot (50 mg) of the pulverized left ventricle was digested in 300 μ l lysis buffer (EDTA 20 mmol l⁻¹, Tris-HCl 50 mmol l⁻¹ and SDS 0.5% w/v) containing Proteinase K (20 mg ml⁻¹, GIBCO BRL) for 3 hours at 50°C. The aliquot was then treated with RNase (10 mg ml⁻¹, GIBCO BRL) for 1 h at 37°C. Total tissue DNA was extracted by the phenol and chloroform procedure. DNA concentration was determined by UV spectrophotometry (260 nm) and DNA content per milligram of the tissue was calculated.

DNA fragmentation

DNA fragmentation was performed as previously described (Tea et al 1999). One μ g of extracted DNA was labeled by enzymatic assay on 3'OH ends using terminal deoxynucleotidyl transferase (tdt, GIBCO BRL) and (³²P)-dCTP (3000Ci/mmol, Amersham) for 1h, at 37°C. Increasing quantities of radiolabeled DNA (1, 2, 4, 8 μ l) were loaded on 1.5 % agarose gel in the presence of one microgram of standard DNA molecular weight (λ DNA/HindIII fragments, GIBCO BRL) to control the variability of the procedure and to increase reproducibility. All samples were then electrophoresed at 100 V, or 3.5h. After electrophoresis, DNA was transferred onto hybond N+ nylon membranes (Amersham) and exposed to a phosphor-sensitive cassette for 48h, then scanned, visualized and quantified by PhosphorImager (ImageQuant, Molecular Dynamics, Sunnyvale CA). Radioactivity associated with 150-1500 bp DNA fragments quantified by PhosphorImager was divided by the value obtained by the standard DNA molecular weight of the same bp length. For each sample, the four values were plotted against the quantity of DNA loaded on the gel and the slope of the linear regression was defined as the DNA fragmentation index.

Another method for quantification of DNA fragmentation was used. Quantification of cytosolic histone-associated DNA fragmentation was performed by the Cell death detection ELISApplus kit (Roche Diagnostics, Canada) following the manufacturer's

instructions. Briefly, left ventricles were homogenized in lysis buffer supplied with the kit followed by centrifugation at 200 g for 10 minutes. Twenty μ l of the extracted cytoplasmic fraction were incubated with 80 μ l of anti-histone-biotin/anti-DNA-POD reagent in a streptavidin-coated microplate for 2 h at room temperature under gentle shaking. The amount of peroxidase retained in the immunocomplex was determined photometrically by incubating with 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonate) (ABTS) as a substrate for 10 to 15 min at 20°C and then the reaction stopped. The change in color was measured at a wavelength of 405 nm against a blank reference wavelength of 490 nm, by using a Vmax Kinetic Microplate Reader (Molecular Devices, Canada). All measurements were performed in duplicate, and samples analyzed on the same microtiter plate in the same setting with control DNA-histone complex sample as a positive control. The OD₄₀₅ reading was then normalized to the total amount of protein in each sample. Data are reported as an apoptotic index (OD₄₀₅ per mg protein) normalized to corresponding vehicle-treated rats, considered as 100%.

DNA synthesis

Other groups of rats were used to evaluate *in vivo* DNA synthesis. Rats were injected intraperitoneally with (methyl-³H)-thymidine (0.5 mCi in 2 ml saline, New England Nuclear) 18h before sacrifice. DNA extraction was performed as described above. Radioactivity in 100 μ g of DNA was counted by liquid scintillation to determine the extent of (methyl-³H)-thymidine incorporation into DNA, an estimate of DNA synthesis.

Apoptosis-Regulatory Proteins

The protein levels of active caspase-3 fragments (17 to 20 kDa), as well as Bcl-2 (anti-apoptotic) and Bax (pro-apoptotic) in the remaining powder of left ventricles were examined by immunoblot analysis.

Membranes of left ventricular tissue were prepared in RIPA buffer as previously described (El-Ayoubi et al, 2003). Protein content was measured spectrophotometrically, using BSA as standard, according to the method of Bradford. Equal amounts of proteins (30 µg) separated on 12.5% SDS-polyacrylamide gel were transferred to Hybond-C extra membrane (Amersham). Membrane were blocked in 5% nonfat milk and incubated with anti-caspase-3 (1:1000, BD Pharmingen), anti-Bax (1:1000, Cell Signalling, Canada), or anti-Bcl-2 (1:1000, BD Transduction Laboratories, Canada). Bound antibodies were detected by a peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antiserum (1:5000, for caspase 3 and Bax) or with goat anti-mouse (1:5000, Bcl-2) and visualized by ECL-Plus chemiluminescence detection (Amersham ECL Hyperfilm).

Histological Analysis

Cross-sections of heart ventricles were stored in neutral buffered formalin for 5 days. After ethanol dehydration and embedding in wax, 5µm slices were obtained using a microtome. Sections were stained with hematoxylin, phloxine, saffron (HPS). Microscopic visualization and photographs were obtained and cell surface measurements were performed by a blinded investigator using computer software (Micro Dimension Version 1.01, 1993). Cell surface was measured in 10 different areas of the sections. Results were obtained from 2 sections per rat from 2 rats each treatment selected at random from the various treatment groups.

Statistical Analysis

Pressure data were collected every hour over 3 days before (baseline) and 28 days after treatment. Results of each 24 h were combined and presented as difference from baseline. All data obtained from moxonidine-treated rats were compared to corresponding saline-treated controls. In some, results were compared to pre-treatment values.

Comparisons were performed by ANOVA followed by Neuman-Keuls Multiple Comparison Test or Dunnett's multiple comparison test, where applicable, using the computer program PRISM. Statistical significance was taken as $p < 0.05$. All data are reported as mean \pm SEM.

2.4 Results

Telemetric measurement of blood pressures show that pressures did not vary significantly in SHR receiving saline-vehicle over 4 weeks (MAP, 131.2 ± 1.0 vs. 136.7 ± 0.6 mmHg). However, moxonidine at 200 and 400 $\mu\text{g/kg/h}$ resulted in immediate mild but significant reduction in MAP, reaching lowest levels after 3-4 days of treatment, then stabilizing at 1 week at -9.0 ± 0.2 and -10.8 ± 0.2 mmHg ($n=3$ each, $p < 0.01$ vs. vehicle), respectively. Table 1 shows that at 1 week, diastolic pressure was significantly reduced ($P < 0.01$) by both moxonidine doses, whereas only the 400 μg dose reduced ($P < 0.01$) systolic pressure as compared to saline-vehicle treated rats. Corresponding heart rates were reduced at 1 week by 200 and 400 μg moxonidine (-40 ± 12 and -48 ± 10 beats/min, below basal, respectively), significantly ($P < 0.01$) different from vehicle treated rats (-8 ± 4 beats/min). Pressures and heart rates were maintained at these levels throughout the 4 weeks of treatment. These concentrations of moxonidine had no significant effect on animal activity during the study period.

Body weight increased in SHR during 4-week treatment with saline-vehicle (191.8 ± 0.9 to 204.3 ± 3.0 g, $P < 0.001$). The body weight gain over 4 weeks was not altered by 50 and 100 μg but was lower by 200 & 400 μg moxonidine, reaching 192.1 ± 2.3 g ($P < 0.01$ vs. corresponding saline-treated rats) by 400 μg dose (Figure 1). The lower gain in body weight ($< 6\%$) may be secondary to improved metabolic profile (Velliquette and

Ernsberger, 2003) as it was not influenced by food intake that remained unchanged during that period.

Left ventricular mass (LVM) increased in vehicle-treated SHR during the 4 weeks of study from 602 ± 9 to 670 ± 8 mg ($P < 0.001$). Whereas the 50 μ g dose had no effect, moxonidine treatment with 100, 200, and 400 μ g resulted in less increase in LVM over time, reaching $93 \pm 2\%$, $88 \pm 1\%$, and $86 \pm 3\%$ of corresponding vehicle-treated control ($P < 0.001$) after 4 weeks, respectively (Figure 2A). The decrease in LVM persisted after normalization to corresponding body weight (3.33 ± 0.03 to 3.09 ± 0.03 , 3.03 ± 0.03 and 3.06 ± 0.20 mg/g body weight ($P < 0.02$), or $94 \pm 1\%$ ($P < 0.01$), $92 \pm 2\%$ ($P < 0.01$) and $94 \pm 2\%$ ($P < 0.04$) of corresponding vehicle-treated rats, respectively. Left ventricular DNA content did not significantly increase with time in vehicle-treated rats 838.7 ± 58.4 vs. 940.9 ± 27.5 μ g ventricle⁻¹ (representing $11 \pm 3\%$ increase). However, moxonidine resulted in progressive reduction in DNA content in SHR left ventricles that reached $69 \pm 6\%$ ($P < 0.01$) of corresponding vehicle-treatment with the 4-week 400 μ g treatment (Figure 2B). The changes in DNA content positively correlated with changes in LVM at all doses and time points ($r^2 = 0.35$, $P < 0.001$, not shown), with highest influence of 4-week treatment ($r^2 = 0.67$, $P < 0.0001$) (Figure 2C)

DNA content may be influenced by synthesis and/or fragmentation. *In vivo* ³H-thymidine incorporation in vehicle-treated SHR increased in a time-dependent manner from 1073 ± 58 to 1378 ± 12 cpm 100 μ g⁻¹ DNA ($P < 0.03$), by 4 weeks. Moxonidine decreased ³H-thymidine incorporation in a dose-dependent manner, reaching 904 ± 36 and 787 ± 29 cpm 100 μ g⁻¹ DNA ($66 \pm 3\%$ and $57 \pm 2\%$ of corresponding vehicle-treated (100%) at 4 weeks of 200 and 400 μ g moxonidine ($P < 0.01$) (Figure 3). On the other hand, DNA fragmentation only increased with 50 μ g moxonidine at 1 week, as compared to corresponding vehicle-treated ($P < 0.01$) and 100 μ g moxonidine treated SHR ($P < 0.05$), then returned to basal values after 4 weeks of treatment (Figure 4A). In confirmation, a similar time- and dose-

dependent pattern of DNA fragmentation was obtained by determining cytoplasmic histone associated mono- and oligonucleosomes by ELISA (Figure 4B).

Western blot analysis of proteins involved in the apoptotic pathway revealed a transient increase in the expression of the apoptotic protein Bax, measured in moxonidine- vs. vehicle-treated rats to represent at 1 week (100 μ g, 112 \pm 5% of corresponding vehicle-treated rats, $P<0.05$); then progressively decreased to reach 82 \pm 6% of corresponding saline-treated rats, $P<0.02$) at 4-week treatment with 400 μ g. The anti-apoptotic Bcl-2 which was not different from vehicle treated control (100%) at 1 week, increased after 2 weeks of treatment with 200 μ g moxonidine, then further increased at 4 weeks of all moxonidine doses ($P<0.03$). Figure 5 shows that the ratio of Bax to Bcl-2 declined at 2 weeks by the 200 μ g dose and at 4 weeks with all treatment doses ($P<0.01$).

Active caspase-3 protein increased after 1 week of treatment with moxonidine 50 and 100 μ g ($P<0.05$) and at 2 weeks with 100 and 200 μ g ($P<0.01$), then decreased thereafter to levels not different from corresponding vehicle-treated SHR. Pro-caspase-3 proteins were not altered by treatment (Figure 6).

Histological analysis revealed that cardiomyocyte cell surface area increased from 465 \pm 1 to 569 \pm 3 μ m² in SHR treated with vehicle for 1 and 4 weeks, respectively. Four-week treatment with moxonidine (50, 100, 200, and 400 μ g) resulted in dose-dependent reduction in cardiomyocyte size to 565 \pm 1; 527 \pm 1; 531 \pm 7; and 488 \pm 7 μ m², respectively, indicating prevention of cardiomyocyte hypertrophy.

2.5 Discussion

The findings of the present study demonstrate that in SHR, chronic antihypertensive treatment with moxonidine is associated with cardiac remodeling, as evidenced by a slower rate of left ventricular mass increase and a reduction in left ventricular DNA content over

time. Changes in cardiac DNA content resulted from a sustained reduction in DNA synthesis and a transient increase in internucleosomal DNA fragmentation, a biological hallmark of apoptosis. The decrease in DNA content appeared to appear during the fourth week of treatment. The mechanisms involved in the transient apoptosis induction included mild Bax and caspase-3 activation, and opposed by later activation of Bcl-2. These studies show that moxonidine mainly inhibits DNA synthesis as part of the mechanisms involved in the control of cardiac mass.

Left ventricular hypertrophy is an independent risk factor for myocardial ischemia, cardiac arrhythmia, congestive heart failure and sudden death. The prognostic significance is considerable, with an increased annual risk of cardiac death of up to 3% (Vakili et al, 2001). Regression of left ventricular mass with antihypertensive therapy is associated with improved diastolic function and overall reduction in cardiovascular events, independent of treatment modality and of decreases in blood pressure. These results support LVH regression as a therapeutic target in hypertension (Okin et al, 2004; Braz Nogueira, 2005; Frey et al, 2004).

Left ventricular hypertrophy in hypertension involves both cellular hypertrophy (mainly in myocytes) and hyperplasia (mainly in fibroblasts), induced by angiotensin II, aldosterone, NE, and endothelin. Cardiomyocyte hypertrophy is mediated by agonist stimulation of respective $G_{q/11}$ coupled receptors, which in turn activate phospholipase C (Singal et al, 2004), promoting cell growth. Schlaich et al (2003) reported that in human hypertension, total systemic and cardiac NE spillover and LV mass index are increased and that LV mass index correlated with cardiac NE spillover, suggesting a growth-promoting effect of increased cardiac sympathetic tone on cardiomyocytes in hypertensive patients (Schlaich et al, 2003). Intravenous infusion of NE in normotensive rats resulted in increased ventricular myocyte TGF-beta isoforms, which correlated with increased mRNA expression of collagens and matrix metalloproteinases. These effects were reduced by treatment with an alpha-adrenoceptor blocker, prazosin (Briest et al, 2004). In vitro,

norepinephrine mimics many features of myocardial remodeling, including hypertrophy of individual myocytes and re-induction of fetal genes. Overexpression of β 1-adrenoceptors in hearts of transgenic mice results in cardiomyocyte hypertrophy, fibrosis, and progressive deterioration of cardiac performance (Bisognano et al, 2000; Engelhardt et al, 1999). Mice that lack dopamine β -hydroxylase, the essential enzyme for the synthesis of norepinephrine, exhibit a blunted hypertrophic response (Esposito et al, 2002). On the other hand, fibroblast proliferation, also induced by active neurohormones in the heart, leads to fibrosis, which involves a disproportionate accumulation of the extracellular matrix proteins, collagen, and fibronectin. The resulting increase in stiffness causes ventricular dysfunction and eventually heart failure. *In vivo* blockade of angiotensin II and catecholamines systems suppresses cardiac fibrosis (Peng et al, 2005; Masson et al, 2001).

Chronic treatment of hypertensive patients with the sympatholytic compounds, moxonidine and rilmenidine, results in blood pressure reduction and regression of LVH (Bobik et al, 1998; Prichard, 1994). Moxonidine also prevents development of left ventricular hypertrophy induced by myocardial infarction (Van Kerckhoven et al, 2004). In addition, moxonidine treatment of 6-month-old stroke prone SHR (SHR-SP) reduced blood pressure and the degree of hypertrophy and myocardial fibrosis, capillarization, and regressive changes of myocytes. Microarteriopathy and activation of nonvascular interstitial cells, which denote the first step in development of interstitial myocardial fibrosis, were significantly suppressed by therapy (Amann et al, 1992).

Hamet et al (1995) have shown that cardiac hypertrophy in SHR might be due, in part, to an imbalance between cell growth and apoptosis, favoring DNA accumulation. Consistent with this, the present studies show that moxonidine treatment is associated with inhibition of DNA synthesis as evidenced by lower ^3H -thymidine incorporation. Preliminary histological analysis revealed that cardiomyocyte size was dose-dependently reduced by treatment. These results indicate that moxonidine treatment hampers the growth signals implicated in fibroblast proliferation and myocyte hypertrophy. On the other hand,

moxonidine treatment is associated with transiently stimulated cardiac cell apoptosis, occurring early (within 1 week) after treatment and subsiding by 4 weeks. Both mechanisms lead to lower DNA accumulation and hence, regression/prevention of LVH.

Apoptosis is a genetically regulated cell death involved in the deletion of cells in normal as well as malignant tissues. Apoptosis requires tightly regulated death pathways, including activation of cysteine proteases of the caspase family. The down stream apoptotic caspase-3 is in an inactive state (~30 kDa), and when an apoptotic stimulus occurs it is cleaved into a biologically active peptide of ~20 kDa and an inactive 12-kDa fragment. In the present study, moxonidine activated caspase-3 as early as 1 week of treatment, indicating stimulated apoptosis only early after treatment. Although moxonidine treatment was continued for 4 weeks, no further apoptosis occurred. The mechanisms underlying caspase activation are not entirely clear, but may include activation of cytochrome *c* released by mitochondria (James 1998). Mitochondrial membrane is stabilized or destabilized by pro- and anti-apoptotic genes Bax and Bcl-2. Thus, higher Bax and lower Bcl-2 would stimulate the release of cytochrome *c* that, in turn, activates caspase 9 and subsequently, caspase 3 (Xu et al, 2005). The relative proportion of Bax to Bcl-2 after 1 and 2 weeks of treatment was not altered by the lower doses of moxonidine, but was reduced by 4 weeks, favouring anti-apoptosis. This response was contrasted by moxonidine-induced caspase 3 and Bax activation after 1 week of treatment, indicating a transient early apoptotic effect. These actions of moxonidine are similar, albeit of a lower magnitude, to those achieved by ACE inhibition in SHR, where enalapril-induced regression of cardiac hypertrophy was associated with increased apoptotic activity (Tea et al, 1999).

The increase in DNA fragmentation appeared larger with the 50 µg dose of the drug, a finding confirmed by two different methods. We postulate that a faster rate for transient apoptosis was induced in response to the higher dose (100 µg) that would be already decreased by 1 week. Further experiments measuring DNA fragmentation at lower doses

and time points earlier than one week may confirm this postulate. The time and dose-dependent dynamic effect on DNA fragmentation was not reflected on DNA content, which was progressively reduced by all doses mainly after 4 weeks. This may be explained by the slightly larger inhibition of DNA synthesis with the higher doses of moxonidine, since DNA content is the result of a balance between DNA synthesis and degradation.

Prevention of LVH in these animals may be secondary to, albeit modest, reduction of blood pressure by moxonidine. However, these studies cannot rule out, at least in part, a pressure-independent effect. We have previously shown a pressure-independent control of left ventricular mass by moxonidine in comparison to hydralazine, a direct vasodilator. Despite equal blood pressure reduction, chronic treatment with hydralazine does not result in LVH regression (Menaouar et al, 2002). Similarly, Tea et al (1999) have shown that, in contrast to enalapril and losartan, reduction in cardiac workload by hydralazine was not associated with changes in cardiac mass, growth, or apoptosis within 4 weeks, even though hydralazine showed a potent antihypertensive effect. These studies with hydralazine clearly demonstrate that cardiac growth and apoptosis can be dissociated from blood pressure regulation.

On the other hand, the sympatholytic effect of moxonidine was more evident on heart rate, causing long-lasting bradycardia. The bradycardiac effect has been shown to result from moxonidine primarily acting centrally on imidazoline I₁-receptors and α 2-adrenoceptors in brainstem rostral ventrolateral medulla as well as on hindbrain sites like the nucleus of the solitary tract, nucleus ambiguus and the dorsal motor nucleus of the vagus to facilitate vagal response (Haxiu et al 1994; Moreira et al 2007). In contrast to its vasodilatory and hypotensive effects, centrally-mediated bradycardiac effect of moxonidine does not involve nitric oxide (Moreira et al 2004). The reduction in sympathetic activity to the heart may have contributed to moxonidine-reduced LVH. Consistent with this, beta-adrenergic receptor blockade in SHR reduces left ventricular DNA via apoptosis during regression of cardiac hypertrophy (Tea et al 1999). It is intriguing to speculate that the

effect on cardiac apoptosis may also be locally mediated and specific to moxonidine activation of imidazoline receptors that we have identified in the heart (El-Ayoubi et al, 2002). However, the contribution of cardiac imidazoline receptors remains to be proven.

The cell type targeted by moxonidine treatment and resulting in apoptosis has not been determined in the present studies, but it is unlikely that moxonidine resulted in loss of myocytes. The myocytes account for 70% of the normal cardiac mass, therefore if more than 30% reduction in DNA content, measured in the present study, occurred in myocytes, the heart weight would be drastically reduced and the heart function would deteriorate, then fail; all not observed in moxonidine-treated rats. The moxonidine-treated rats showed activated Bcl-2 and reduced Bax, hence a significant reduction in Bax to Bcl-2 ratio after 4 weeks of treatment, which may protect cardiac myocytes from apoptosis, and was associated with back to normal concentrations of ANP mRNA and BNP mRNA in the left ventricles (El-Ayoubi et al, 2003), markers of regression of LVH and treatment efficacy. Also, previous studies have shown that moxonidine has an anti-fibrotic effect (Ziegler et al, 1996), thus implicating fibroblasts in the action. In agreement, treatment of SHR with inhibitors of the renin-angiotensin system is associated with regression of cardiac hypertrophy by apoptotic mechanisms that occur in fibroblasts (Der Sarkissian et al, 2003).

In conclusion, these studies reveal a cardioprotective effect of moxonidine on the hypertensive rat heart. This effect is evidenced by hampered progression of left ventricular mass and reduced DNA content, resulting from a sustained reduction of DNA synthesis and transient stimulation of DNA fragmentation that occur early after treatment. Future experiments should investigate the cardiac cell type-targeted by moxonidine.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (MOP-57714 to SMD and JG and 45452 to DD) and the Heart and Stroke Foundation of

Canada (to SMD and JG). D. Duguay holds an award from the Canadian Institutes of Health Research.

2.6 References

- Amador N, de Jesus Encarnacion J, Rodriguez L, Tello A, Lopez M, Guizar JM (2004). Relationship between left ventricular mass and heart sympathetic activity in male obese subjects. *Arch Med Res* 35: 411-415.
- Amann K, Greber D, Gharehbaghi H, Wiest G, Lange B, Ganten U, Mattfeldt T, Mall G. (1992) Effects of nifedipine and moxonidine on cardiac structure in spontaneously hypertensive rats. Stereological studies on myocytes, capillaries, arteries, and cardiac interstitium. *Am J Hypertens* 5: 76-83.
- Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ, Pende A, Raynolds MV, Sastravaha A, Roden R, Asano K, Blaxall BC, Wu SC, Communal C, Singh K, Colucci W, Bristow MR, Port DJ (2000). Myocardial directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 32: 817-830.
- Bobik A, Dilley R, Kanellakis P (1998). Sympatho-adrenal mechanisms regulating cardiovascular hypertrophy in primary hypertension: a role for rilmenidine? *J Hypertens* 16: S51-54.
- Braz Nogueira J (2005). Regression of left ventricular hypertrophy in hypertension--does it reduce cardiovascular risk? *Rev Port Cardiol* 24: 1007-1013.
- Briest W, Homagk L, Rassler B, Ziegelhoffer-Mihalovicova B, Meier H, Tannapfel A, Leiblein S, Saalbach A, Deten A, Zimmer HG (2004). Norepinephrine-induced changes in cardiac transforming growth factor-beta isoform expression pattern of female and male rats. *Hypertension* 44: 410-418.
- Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DL, Colucci WS (1998). Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest* 101: 812-818.

- Der Sarkissian S, Marchand EL, Duguay D, Hamet P, deBlois D (2003). Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. *Cardiovasc Res* 57: 775-783.
- El-Ayoubi R, Gutkowska J, Regunathan S, Mukaddam-Daher S (2002). Imidazoline receptors in the heart: characterization, distribution, and regulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 39: 875-883.
- El-Ayoubi R, Menaouar A, Gutkowska J, Mukaddam-Daher S (2003). Normalization of up-regulated cardiac imidazoline I₁-receptors and natriuretic peptides by chronic treatment with moxonidine. *Ann N Y Acad Sci* 1009: 274-278.
- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7059-7064.
- Esposito G, Rapacciuolo A, Naga Prasad SV, Takaoka H, Thomas SA, Koch WJ, Rockman HA (2002). Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation* 105: 85-92.
- Frey N, Katus HA, Olson EN, and Hill JA (2004) Hypertrophy of the Heart. A New Therapeutic Target? *Circulation* 109: 1580-1589.
- Grassi G (2004) Counteracting the sympathetic nervous system in essential hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13: 513-519.
- Greenwood JP, Scott EM, Stoker JB, Mary DA (2000). Chronic I(1)-imidazoline agonism: sympathetic mechanisms in hypertension. *Hypertension* 35: 1264-1269.
- Hamet P, Richard L, Dam TV, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, Gossard F, Tremblay J (1995). Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 26: 642-648.

Haxhiu MA, Dreshaj I, Schafer SG, Ernsberger P (1994). Selective antihypertensive action of moxonidine is mediated mainly by I1-imidazoline receptors in the rostral ventrolateral medulla. *J Cardiovasc Pharmacol* 24: S1-8.

Ishimitsu T, Kobayashi T, Honda T, Takahashi M, Minami J, Ohta S, Inada H, Yoshii M, Ono H, Matsuoka H (2005). Protective effects of an angiotensin II receptor blocker and a long-acting calcium channel blocker against cardiovascular organ injuries in hypertensive patients. *Hypertens Res* 28: 351-359.

James TN (1998). Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. *Annu Rev Physiol* 60: 309–325.

Liao Y, Asakura M, Takashima S, Ogai A, Asano Y, Shintani Y, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Kitamura S, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M (2004). Celiprolol, a vasodilatory beta-blocker, inhibits pressure overload-induced cardiac hypertrophy and prevents the transition to heart failure via nitric oxide-dependent mechanisms in mice. *Circulation* 110: 692-699.

Mall G, Greber D, Gharenbaghi H, Wiest G, Amann K, Mattfeldt T (1991). Effects of nifedipine and moxonidine on cardiac structure in spontaneously hypertensive rats (SHR)--stereological studies on myocytes, capillaries, arteries, and cardiac interstitium. *Basic Res Cardiol* 86 Suppl 3: 33-44.

Masson S, Chimenti S, Salio M, Torri M, Limana F, Bernasconi R, Calvillo L, Santambrogio D, Gagliano N, Arosio B, Annoni G, Razzetti R, Bongrani S, Latini R (2001). CHF-1024, a DA2/alpha2 agonist, blunts norepinephrine excretion and cardiac fibrosis in pressure overload. *Cardiovasc Drugs Ther* 15: 131-138.

Menaouar A, El-Ayoubi R, Jankowski M, Gutkowska J, Mukaddam-Daher S (2002). Chronic imidazoline receptor activation in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertension* 15: 803-808.

Messerli F (2000). Moxonidine: a new and versatile antihypertensive. *J Cardiovasc Pharmacol* 35 (7 Suppl 4): S53-56.

Moreira TS, Takakura AC, Menani JV, Sato MA, Colombari E (2004). Central blockade of nitric oxide synthesis reduces moxonidine-induced hypotension, *Br J Pharmacol* 142: 765-771.

Moreira TS, Takakura AC, Menani JV, Colombari E (2007). Involvement of central alpha1- and alpha2-adrenoceptors on cardiovascular responses to moxonidine. *Eur J Pharmacol* 563(1-3):164-171. Epub 2007 Feb 16

Okin PM, Devereux RB, Jern S, Kjeldsen SE, Julius S, Nieminen MS, Snapinn S, Harris KE, Aurup P, Edelman JM, Wedel H, Lindholm LH, and Dahlof B (LIFE Study Investigators) (2004) Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy during antihypertensive treatment and the prediction of major cardiovascular events. *JAMA* 292: 2343-2349.

Peng H, Carretero OA, Vuljaj N, Liao TD, Motivala A, Peterson EL, Rhaleb NE (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitors: a new mechanism of action. *Circulation* 112: 2436-2445.

Prichard BN (1994). Clinical experience with moxonidine. *Cardiovasc Drugs Ther* 8 Suppl 1: 49-58.

Schlaich MP, Kaye DM, Lambert E, Sommerville M, Socratous F, Esler MD (2003). Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circulation* 108: 560-565.

Singal T, Dhalla NS, Tappia PS (2004). Phospholipase C may be involved in norepinephrine-induced cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 1015-1019.

- Tea BS, Dam TV, Moreau P, Hamet P, deBlois D (1999). Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension* 34: 229-235.
- Vakili BA, Okin PM, Devereux RB (2001). Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J* 141: 334-341.
- Van Kerckhoven R, van Veghel R, Saxena PR, Schoemaker RG (2004). Pharmacological therapy can increase capillary density in post-infarction remodeled rat hearts. *Cardiovasc Res* 61: 620-629.
- Varo N, Etayo JC, Zalba G, Beaumont J, Iraburu MJ, Montiel C, Gil MJ, Monreal I, Diez J (1999). Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 17: 107-114.
- Velliquette RA, Ernsberger P (2003). Contrasting metabolic effects of antihypertensive agents. *J Pharmacol Exp Ther* 307:1104-1111.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115: 2656-2664.
- Yasunari K, Maeda K, Nakamura M, Watanabe T, Yoshikawa J, Hirohashi K (2005). Left ventricular hypertrophy and angiotensin II receptor blocking agents. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 3: 61-67.
- Ziegler D, Haxhiu MA, Kaan EC, Papp JG, Ernsberger P (1996). Pharmacology of moxonidine, an I1-imidazoline receptor agonist. *J Cardiovasc Pharmacol* 27 Suppl 3: S26-37.

2.7 Figure legends, figures and table

Figure 1. The effect of 4-weeks treatment with various concentrations of moxonidine on body weight *P<0.001 vs. basal; **P<0.01 vs. corresponding vehicle-treated groups; n= 8 to 23 rats per group.

Figure 2. The effect of 1, 2, and 4-week treatment with various concentrations of moxonidine on: (A) left ventricular mass and (B) left ventricular DNA content, presented as percent of corresponding vehicle-treated rats (100%). (C) Correlation between percent decrease in left ventricular mass vs. percent decrease in DNA content in 4-week moxonidine-treated SHR. *P<0.01 vs. corresponding vehicle-treated groups; n=6-8 rats per group.

Figure 3. The effect of 1, 2, and 4-week treatment with various concentrations of moxonidine on left ventricular ^3H -thymidine incorporation, presented as percent of corresponding vehicle-treated rats (100%). *P<0.04; **P<0.01 vs. corresponding vehicle-treated groups; n=3-5 rats per group.

Figure 4. The effect of 1, 2, and 4-week treatment with various concentrations of moxonidine on left ventricular DNA fragmentation. A: DNA laddering, n= 3-7 rats per group; B: Cell Death Detection by ELISA, n= 3-6 rats per group. *P<0.01; #P<0.05 vs. corresponding vehicle-treated groups. $^{\$}P<0.05$ vs. corresponding 100 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ moxonidine-treated group. Data presented as percent of vehicle-treated control (100%).

Figure 5. Representative Western blot analysis of the effect of 1, 2, and 4-week treatment with moxonidine on left ventricular Bax and Bcl-2 proteins. Column graph represents Bax/Bcl-2 ratio. * $P < 0.01$ vs. corresponding vehicle-treated SHR; $n = 5-7$ rats per group.

Figure 6. Western blot analysis of the effect of 1, 2, and 4-week treatment with moxonidine on left ventricular pro- and cleaved caspase-3 protein expression. Column graph represents cleaved to pro-caspase-3 ratio. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. vehicle-treated SHR. $n = 6-9$ rats per group.

Figure 1

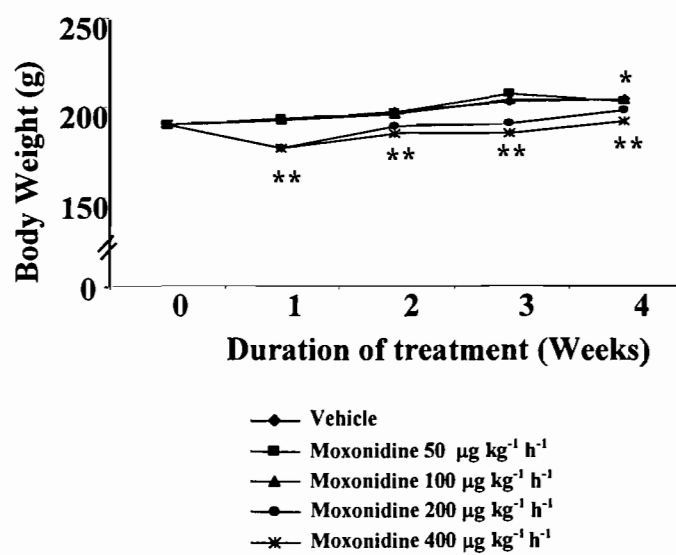


Figure 2

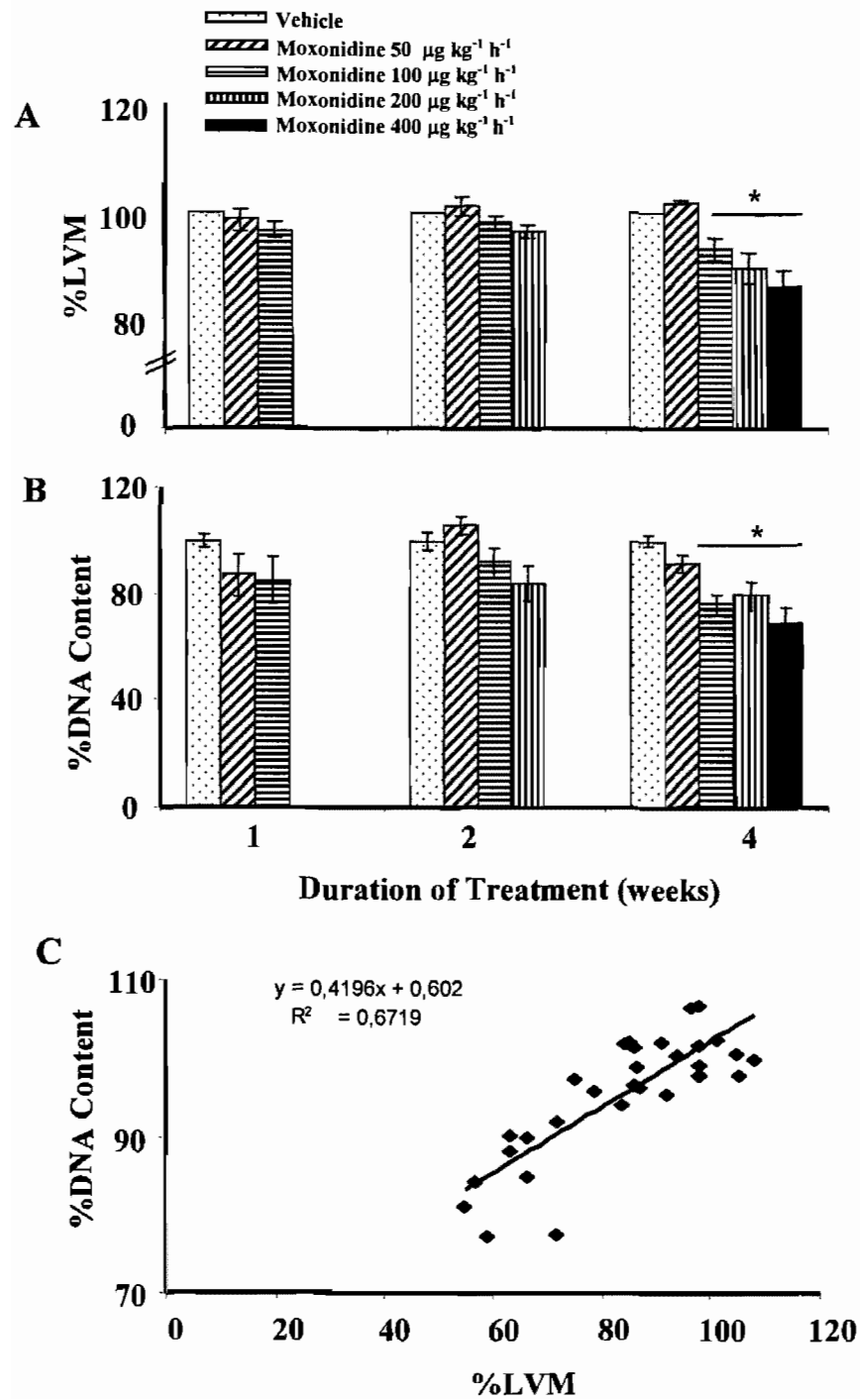


Figure 3

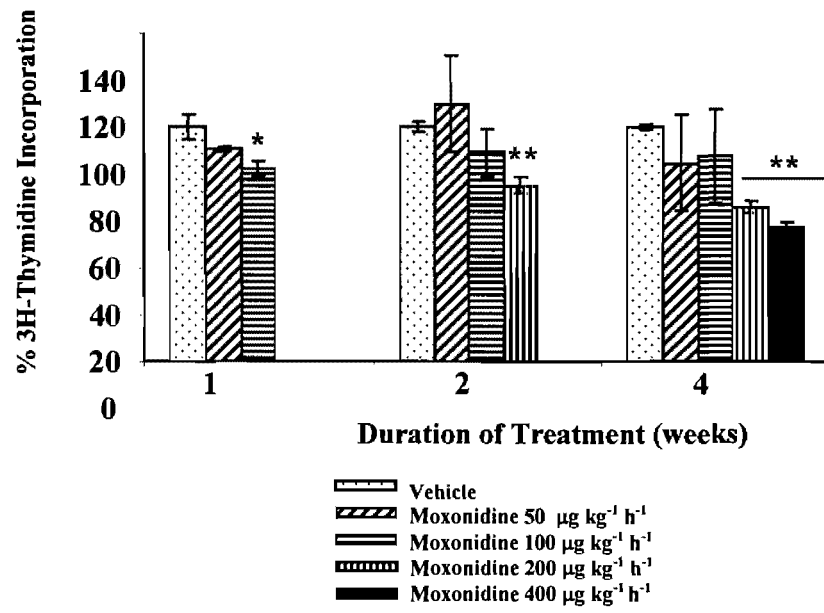


Figure 4

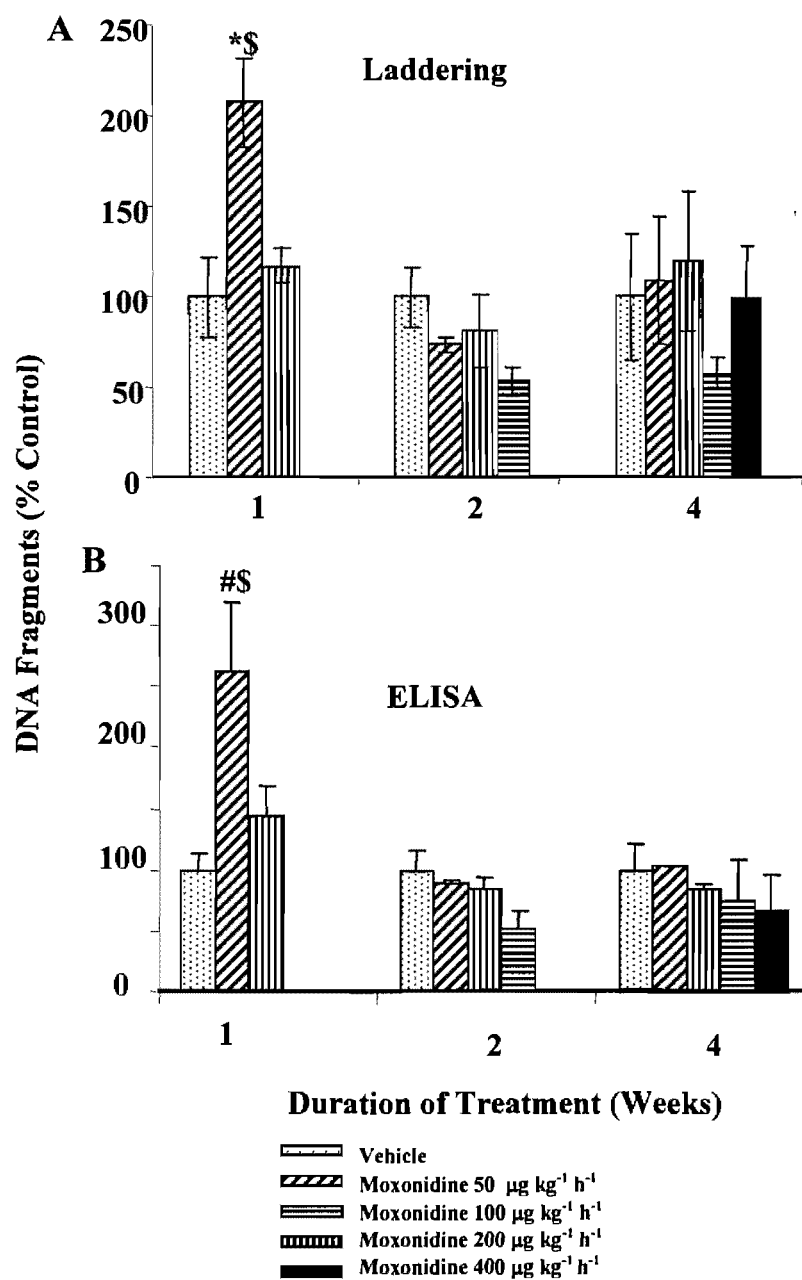


Figure 5

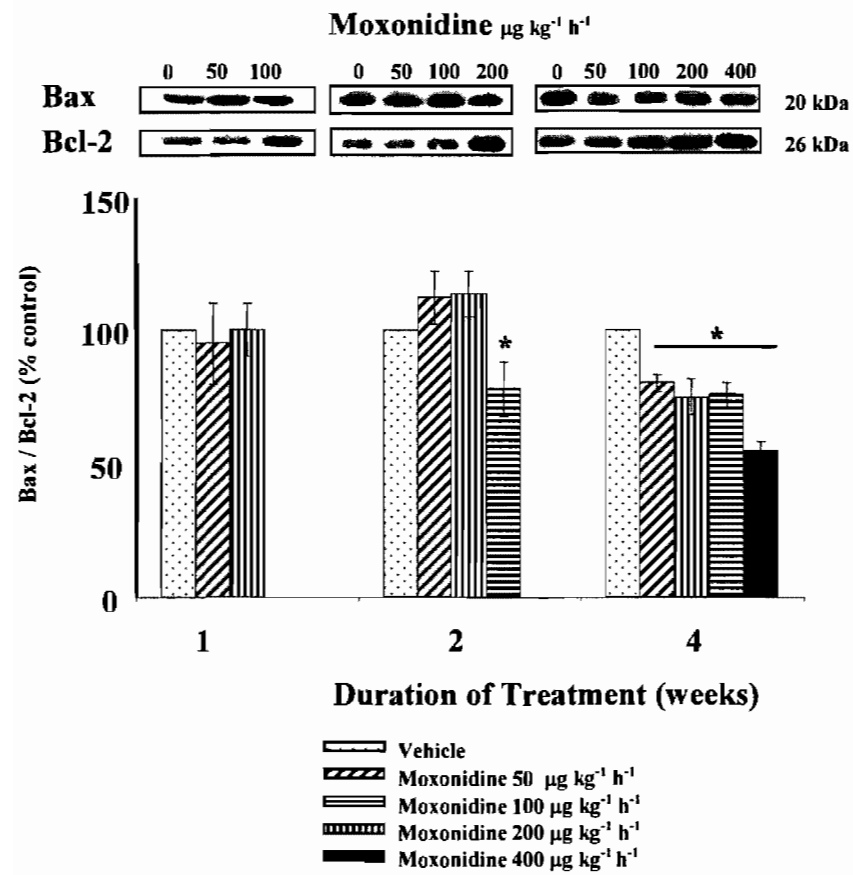


Figure 6

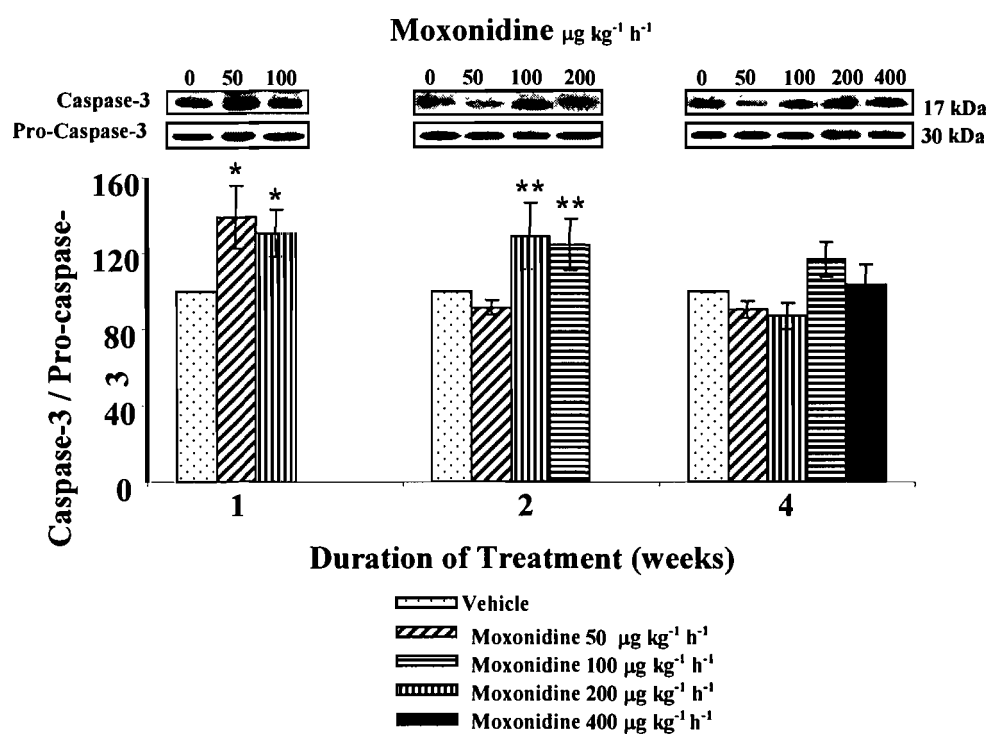


Table 1

Table 1: Telemetric measurement of blood pressures and heart rate (HR) after 1 week of treatment. Data obtained on days 6 and 7 of treatment are averaged and presented as difference from basal.

	Diastolic (mmHg)	Systolic (mmHg)	MAP (mmHg)	HR (beats/min)
Vehicle	-0.8 ± 0.5	-1.1 ± 0.2	-4.0 ± 0.1	-8 ± 4
Moxonidine (200 µg kg ⁻¹ h ⁻¹)	-6.7 ± 0.5*	-9.6 ± 1.1	-9.0 ± 0.2*	-40 ± 12*
Moxonidine (400 µg kg ⁻¹ h ⁻¹)	-8.7 ± 0.4*	-11.1 ± 2.1*	-10.8 ± 0.2*	-48 ± 10*

*P<0.01 vs. corresponding vehicle-treated rats.

3. Discussion

Les résultats obtenus démontrent que dans les SHR, le traitement antihypertensif avec la moxonidine est associé avec le remodelage cardiaque, mis en évidence par une plus lente augmentation de la masse du ventricule gauche et une réduction du contenu en ADN du ventricule gauche. Les changements dans le contenu en ADN proviennent d'une réduction soutenue de la synthèse de l'ADN et une augmentation transitoire de la fragmentation internucléosomale de l'ADN, un marqueur de l'apoptose. La diminution du contenu en ADN semble apparaître surtout durant la quatrième semaine de traitement. Les mécanismes impliqués dans l'induction de l'apoptose incluent une augmentation modérée de l'expression de Bax et de la caspase-3 et une augmentation tardive de Bcl-2. Ces études démontrent l'un des principaux mécanismes du contrôle de la masse cardiaque par la moxonidine provient de l'inhibition de la synthèse de l'ADN.

L'HVG augmente les risques d'événements cardiovasculaires par ses effets arythmogènes ainsi que ses effets sur la fonction ventriculaire et sur la circulation coronaire. Plusieurs études ont démontré que l'HVG est un signe de morbidité et mortalité. Le pronostic d'HVG est associé à une augmentation annuelle du risque de mort cardiovasculaire jusqu'à 3% (Vakili et al, 2001).

Les traitements antihypertensifs visant à réduire la pression artérielle peuvent faire régresser l'HVG et peuvent réduire, sans toutefois éliminer, l'augmentation des risques d'événements cardiovasculaire majeurs (Mathew et al, 2001; Collins et al, 1990). La régression de la masse du ventricule gauche, indépendamment de la pression sanguine, par des traitements antihypertensifs est associée avec une fonction diastolique améliorée et avec des taux de morbidité et de mortalité diminués (Frey et al, 2004). Ces résultats supportent la régression de l'HVG comme une cible thérapeutique en hypertension.

Nous avons démontré que le traitement à la moxonidine réduit la progression de l'hypertrophie du ventricule gauche chez les rats SHR. En effet, l'augmentation de la masse du ventricule gauche durant les quatre semaines d'étude est plus faible lorsque les SHR sont traités à la moxonidine. La réduction de l'HVG pourrait être influencée par la

diminution de la pression sanguine. Le développement de l'hypertrophie cardiaque en hypertension est en partie transmise par une stimulation des adrénorécepteurs α et β , plutôt que seulement par les changements hémodynamiques (Schobel et al, 1996, Zierhut et Zimmer, 1989). Donc, l'inhibition du SNS par la moxonidine permettrait un effet direct et rapide sur le tissu cardiaque.

Similaires à nos résultats, l'utilisation de la rilmenidine, qui est, au même titre que la moxonidine, un composé de la deuxième génération d'agents antihypertenseurs centraux et un agoniste des récepteurs aux imidazoles, chez les lapins hypertendus *one-kidney one-clip*, entraîne une réduction de la masse du ventricule gauche de 18%, en plus d'améliorer la fonction cardiaque (Signolet et al, 2008). De plus, le traitement à la moxonidine suivant un infarctus du myocarde chez des rats entraîne une atténuation du remodelage du ventricule gauche démontrée par une normalisation de la masse du ventricule gauche et du collagène interstitiel aux mêmes niveaux que les rats n'ayant pas subi d'infarctus du myocarde (van Kerckhoven et al, 2000). La prévention de l'hypertrophie du ventricule gauche induite par la moxonidine pourrait donc être bénéfique pour le cœur et ainsi diminuer les risques d'évènements cardiovasculaires.

L'hypertrophie du ventricule gauche en hypertension implique l'hypertrophie cellulaire (surtout les cardiomyocytes) et l'hyperplasie (surtout les fibroblastes). L'hypertrophie et l'hyperplasie sont induites, entre autre, par l'Ang-II, l'aldostérone, la NE et l'endothéline.

L'activité sympathique et le neurotransmetteur NE sont augmentés chez les patients hypertendus dans plusieurs organes, incluant le cœur. Chez l'humain en hypertension, le relâchement de NE au cœur est augmenté et cette augmentation est en corrélation avec l'index de la masse du ventricule gauche (Schlaich et al, 2003), suggérant un effet hypertrophique de la NE au cœur.

L'infusion de la norépinéphrine chez les rats normotendus modifie la fonction des ventricules et induit l'hypertrophie du ventricule gauche (Irlbeck et al, 1996). La stimulation des fibroblastes par les neurohormones mène à la fibrose, qui est une accumulation disproportionnée de protéines de la matrice extracellulaire, de collagène et de fibronectine. L'accumulation de ces protéines cause une augmentation de la rigidité du cœur menant à une dysfonction ventriculaire et, éventuellement, à l'insuffisance cardiaque (Brilla, 1994).

L'infusion de NE induit des changements dans l'expression des gènes du collagène de type I et III et des métalloprotéinases (Briest et al, 2001). Aussi, l'infusion de NE induit l'augmentation de l'expression des isoformes du TGF- β , qui est une protéine régulant la croissance et jouant un rôle essentiel dans la réparation des tissus et dans la formation de la matrice extracellulaire. En effet, cette augmentation de TGF- β est en corrélation avec l'augmentation de l'expression d'ARNm des différents types de collagène et des métalloprotéinases de la matrice. Ces effets ont été réduits par l'inhibition de l'action de NE, en bloquant les récepteurs α et β -adrénergiques avec la prazosin et le metoprolol, respectivement, démontrant l'implication de la stimulation de ces deux types de récepteurs (Briest et al, 2004).

La stimulation de la fréquence et de la force de contraction du cœur par la NE se fait via les récepteurs β -adrénergiques. La majorité des récepteurs β -adrénergiques du cœur sont du sous-type β_1 . La surexpression des récepteurs β_1 -adrénergiques du cœur chez les souris transgéniques conduit à l'hypertrophie des cardiomyocytes, la fibrose et la détérioration progressive de la performance cardiaque (Bisognano et al, 2000; Engelhardt et al, 1999).

Un modèle de souris ne produisant pas de NE endogène a été créé par la délétion du gène de la dopamine β -hydroxylase, le gène essentiel dans la biosynthèse de la voie de transformation de la dopamine en norépinéphrine (voir Figure 3). Ces souris présentent une

hypertrophie du ventricule gauche diminuée (Esposito et al, 2002), indiquant que la NE est un important facteur dans l'induction de l'HVG.

In vitro, la NE imite plusieurs caractéristiques du remodelage myocardique, tels que l'hypertrophie de chacun des cardiomyocytes et la réinduction des gènes fœtaux. Il a été démontré que la NE augmente la taille des cardiomyocytes d'une manière dose-dépendante (Simpson, 1983). La NE stimule le récepteur α_1 -adrénergiques qui active la phospholipase C via la classe Gq des protéines liant le GTP. Les effets hypertrophiques des agonistes des récepteurs couplés au Gq, associés avec l'activation de la phospholipase C, ont été démontrés par une augmentation du contenu en inositol phosphate et en diacylglycérol dans les cardiomyocytes. La surexpression des récepteurs qui stimulent Gq / phospholipase C mène à l'hypertrophie des cardiomyocytes. Par contre, la surexpression des récepteurs couplés à un Gq muté ou Gi n'entraîne pas de réponses hypertrophiques (Ramirez et al, 1995).

L'effet bénéfique de la moxonidine sur la régression/prévention de l'HVG peut être secondaire à l'inhibition de l'activité du SNS et au relâchement subséquent de NE. Nous n'avons pas mesuré l'activité du système nerveux sympathique ou les niveaux de norépinéphrine. Par contre, d'autres études ont démontré que chez les SHR, qui possèdent un SNS activé et des niveaux élevés de NE, la moxonidine réduit ces niveaux par son action sur les récepteurs aux imidazolines en plus de ses propriétés d'agoniste des récepteurs α -2 adrénergiques (Raasch et al, 2003). Aussi, le traitement à la moxonidine supprime l'augmentation de l'activité du SNS chez les SHR (van Kerckhoven et al, 2000), démontré par une réduction de la fréquence cardiaque et des niveaux de NE plasmatiques. Chez des patients en insuffisance cardiaque, le traitement à la moxonidine, par son action sur les récepteurs aux imidazolines et les récepteurs adrénergiques du SNC, entraîne une baisse des niveaux plasmatiques de NE (Swedberg et al, 2002) ainsi qu'une baisse de l'activité du SNS (Swedberg et al, 2000), mesurées par une réduction de la fréquence cardiaque et de l'activité sympathique périphérique.

La moxonidine a causé une prévention/régression de l'HVG qui est associée avec une plus petite taille des cardiomyocytes. En effet, des études préliminaires d'histologie démontrent que le traitement à la moxonidine réduit de manière dose-dépendante la taille des cardiomyocytes. Similaires à ces résultats, des études d'histologies chez des rats avec une hypertrophie concentrique induite par un infarctus ont démontré que le traitement à la moxonidine normalise la taille des cardiomyocytes au niveau de celle des rats contrôles (van Kerckhoven et al, 2002).

Le contenu en ADN est déterminé par une balance dynamique entre la synthèse et la dégradation de l'ADN. Hamet et al (1995) ont démontré que l'hypertrophie cardiaque chez les SHR pourrait être due, en partie, à un déséquilibre entre la croissance cellulaire et l'apoptose, ce qui favoriserait l'accumulation d'ADN. En accord avec ces résultats, nous avons démontré que le traitement à la moxonidine est associé avec une inhibition de la synthèse de l'ADN, démontré par une diminution de l'incorporation de la thymidine-3H. Ce résultat indique que le traitement à la moxonidine gêne la croissance cellulaire. De plus, le traitement à la moxonidine est aussi associé avec une stimulation de l'apoptose des cellules cardiaques qui se produit tôt après le début du traitement (à l'intérieur d'une semaine), puis qui diminue à quatre semaines de traitement. Ces deux mécanismes entraînent une diminution de l'accumulation d'ADN et, donc, la régression ou prévention de l'HVG. Des résultats similaires ont été obtenus chez les SHR avec un traitement au losartan, un ARB, soit une inhibition de la synthèse de l'ADN soutenue pendant les 4 semaines de traitement et une augmentation de la fragmentation d'ADN après 1 et 2 semaines de traitement, puis une diminution après 4 semaines (Tea et al, 1999). La synthèse et la dégradation de l'ADN peuvent être régulés indépendamment dans le cœur à la suite d'un traitement. Tea et al (1999) démontrent que l'utilisation d'un IECA (enalapril) entraîne une augmentation de la fragmentation de l'ADN après 2 et 4 semaines de traitement, malgré une inhibition similaire de la synthèse de l'ADN.

Il a été démontré que lorsque le cardiomyocyte adulte, qui ne peut se diviser, ne peut plus augmenter sa taille, la cellule entre en processus de mort cellulaire. En diminuant la taille des cardiomyocytes, le traitement à la moxonidine prévient l'entrée des cardiomyocytes en apoptose et ainsi prévient la mort de ces cellules. En réduisant la quantité de cardiomyocytes morts, la moxonidine préviendrait la transition de l'hypertrophie cardiaque vers l'insuffisance cardiaque.

L'activation de la caspase-3 est un marqueur de l'apoptose. La caspase-3 est dans un état inactif (~30kDa) et est clivée en un peptide biologiquement actif d'environ 20 kDa et un fragment inactif de 12 kDa lorsqu'il y a stimulus apoptotique. Dans un modèle de rat d'ischémie/reperfusion, il a été démontré, avec des analyses d'immunohistochimie, que les niveaux de caspase-3 étaient augmentés dans le ventricule gauche du cœur, et que cette augmentation était localisée dans les régions qui ont subi l'ischémie (Black et al, 1998). Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que l'inhibition de la caspase-3 est bénéfique pour le remodelage du ventricule gauche et les cardiomyopathies (Huang et al, 2000; Gustafsson et al, 2004; Zhao et al, 2001). Plusieurs de ces inhibiteurs de la caspase-3 ont des actions sur les protéines mitochondriales de la famille de Bcl-2 (Li et Cohen, 2005).

Dans cette étude, le traitement à la moxonidine active la caspase-3 dès la première semaine de traitement, ce qui indique une stimulation de l'apoptose rapidement après le début du traitement. Même si le traitement à la moxonidine a été continué pendant 4 semaines, il n'y a pas eu davantage d'apoptose. Le traitement à la moxonidine induit donc une apoptose transitoire dans les cellules cardiaques. Les mécanismes qui causent l'activation de la caspase-3 ne sont pas complètement élucidés, mais pourrait inclure l'activation de Bax et du relâchement du cytochrome c par la mitochondrie (James, 1998).

La membrane mitochondriale est stabilisée ou déstabilisée par des protéines anti- ou pro-apoptotiques. Une plus grande quantité de la protéine pro-apoptotique Bax stimulerait le relâchement du cytochrome c de la mitochondrie et, donc, une augmentation de

l'activation de la caspase-3. Inversement, une plus grande quantité de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 empêcherait le relâchement du cytochrome c.

Des études ont démontré que les niveaux de Bax sont augmentés dans des modèles d'ischémie/reperfusion (Moudgil et al, 2001) et d'insuffisance cardiaque (Kumar et al, 2001). D'autres études ont démontré que des souris transgéniques sans expression de Bax possèdent une plus grande tolérance aux dommages causés par l'ischémie/reperfusion (Hochhauser et al, 2003).

Moorjani et al, (2007) proposent que l'augmentation de l'expression de Bcl-2 soit un mécanisme compensatoire lors de la transition vers l'insuffisance cardiaque. L'augmentation du ratio de Bax/Bcl-2 contribue à une augmentation du taux d'apoptose des cardiomyocytes (Bartling et al, 1999). Donc, une expression de Bax augmentée et/ou une expression de Bcl-2 diminuée stimulerait le relâchement du cytochrome c de la mitochondrie et, conséquemment, l'activation de la caspase-9, puis de la caspase-3 (Xu et al, 2005).

Nous avons démontré que le traitement à la moxonidine réduit, après quatre semaines, l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax. La diminution de l'expression de Bax par la moxonidine démontre un effet anti-apoptotique. Le traitement à la moxonidine démontre aussi une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 après quatre semaines. Lorsque présentés sous forme d'indice d'apoptose, le ratio Bax/Bcl-2, après une et deux semaines de traitement, n'a pas été modifié par le traitement à la moxonidine. Par contre, le ratio Bax/Bcl-2 a été réduit après 4 semaines de traitement à la moxonidine, démontrant un effet anti-apoptotique. Ces résultats démontrent que le traitement à la moxonidine est associé avec une baisse de l'apoptose des cellules du ventricule gauche après 4 semaines de traitement.

La fragmentation de l'ADN est le clivage endonucléotique de l'ADN génomique en des fragments d'oligonucléotides. La fragmentation de l'ADN s'effectue à des sites entre

les nucléosomes, des structures faites de protéines qui se lient à la chromatine à des intervalles d'environ 200 paires de bases, donnant ainsi un motif en échelle à des intervalles de 200 paires de bases lorsque analysé sur un gel d'agarose. Cette dégradation de l'ADN est différente de la nécrose, où il y a dégradation aléatoire de l'ADN, démontrée par une traînée continue de fragments d'ADN sur les gels d'agarose. La fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine sont considérées comme des marqueurs de l'apoptose.

L'augmentation de la fragmentation de l'ADN apparaît plus grande avec la dose la plus faible utilisée, soit 50µg de moxonidine. Il a donc été postulé qu'un taux d'apoptose encore plus rapide serait induit en réponse aux doses plus grandes et que la fragmentation de l'ADN serait déjà à la baisse après une semaine de traitement. D'autres expériences mesurant la fragmentation de l'ADN à des doses plus basse et à des durées de moins d'une semaine pourraient permettre de confirmer cette hypothèse.

Le manque de parallélisme entre la baisse de pression sanguine et la réduction du contenu en ADN, à chaque durée de traitement étudiée, suggère un contrôle du contenu en ADN sensible à la moxonidine et indépendant de la pression. Nous avons démontré précédemment un contrôle de la masse du ventricule gauche indépendant de la pression par la moxonidine en comparaison avec l'hydralazine, un vasodilatateur. Les traitements à la moxonidine et à l'hydralazine démontraient une réduction similaire de la pression sanguine, mais seulement le traitement à la moxonidine induisait une régression de l'HVG (Menaouar et al, 2002). D'autres études utilisant l'enalapril (IECA), le losartan (ARB) et l'hydralazine ont démontré que, malgré un effet antihypertensif similaire, le traitement à l'hydralazine n'était pas associé avec des changements dans la masse du cœur ainsi que dans la croissance ou l'apoptose des cellules cardiaques, changements observées avec les autres traitements (Tea et al, 1999). Ces résultats démontrent que la croissance et l'apoptose au cœur peuvent être dissociés de la régulation de la pression sanguine.

En plus d'une baisse de la pression sanguine, l'effet sympatholytique de la moxonidine est démontré par une bradycardie. L'effet bradycardique provient

principalement de l'action centrale de la moxonidine sur les récepteurs aux imidazolines et des récepteurs α -2 adrénergiques présents dans la RVLM du bulbe rachidien (Haxiu et al, 1994). La réduction de l'activité sympathique au cœur peut avoir contribué à la réduction de l'HVG par la moxonidine. En accord avec cette affirmation, le blocage des récepteurs β -adrénergiques induit une réduction du contenu en ADN du ventricule gauche par apoptose durant la régression de l'HVG (Tea et al, 1999). La moxonidine pourrait activer l'apoptose localement au cœur par son effet sur les récepteurs aux imidazolines présents au cœur (El-Ayoubi et al, 2002). Par contre, la contribution des récepteurs aux imidazolines du cœur reste encore à être prouvée.

Le type cellulaire ciblé par le traitement à la moxonidine n'a pas été encore déterminé. Par contre, il est peu probable que la moxonidine entraîne la perte de cardiomyocytes. Les myocytes comptent pour environ 70% de la masse normale du cœur. Donc, si la réduction de 30% du contenu en ADN, mesurée dans cette étude, se passait dans les cardiomyocytes, la masse du cœur serait réduite de manière drastique et la fonction cardiaque serait détériorée puis le cœur deviendrait insuffisant. Ces hypothèses n'ont pas été observées chez les rats traités à la moxonidine. Par contre, l'effet cardioprotectif de la moxonidine est mis en évidence par plusieurs facteurs : Les rats traités à la moxonidine démontrent une augmentation de l'expression de Bcl-2 et une diminution de l'expression de Bax. Le ratio Bax/Bcl-2 est diminué significativement après quatre semaines de traitement, ce qui pourrait protéger les cardiomyocytes de l'apoptose.

Le traitement à la moxonidine est aussi associé avec des expressions normalisées d'ARN messager d'ANP et de BNP dans les ventricules gauches (El-Ayoubi et al, 2003), qui sont des marqueurs de régression de l'HVG et, donc, des marqueurs de l'efficacité du traitement. De plus, des études précédentes ont démontré que la moxonidine possède des effets anti-fibrotiques (Ziegler et al, 1996), impliquant donc les fibroblastes dans l'action de la moxonidine. Les traitements des SHR avec des inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone ont d'ailleurs déjà été associés avec la régression de

l'hypertrophie cardiaque par des mécanismes se produisant dans les fibroblastes (Des Sarkissan et al, 2003).

3.1 Conclusion

En conclusion, le traitement à la moxonidine chez les SHR entraîne une réduction de la progression de la masse du ventricule gauche et une réduction du contenu en ADN, résultant d'une réduction soutenue de la synthèse de l'ADN et une stimulation transitoire de la fragmentation de l'ADN débutant tôt après l'initiation du traitement.

À la lumière de ces résultats, cette étude démontre un effet cardioprotecteur de la moxonidine chez les SHR.

3.2 Perspectives

Le traitement avec la clonidine réduit la pression sanguine mais n'entraîne pas de réduction de la masse du ventricule gauche chez les SHR (Jin et al, 1994). Ce n'est pas surprenant, puisque la clonidine possède environ 30 fois moins d'affinité pour les récepteurs aux imidazolines que la rilmenidine et la moxonidine (Ernsberger et al, 1993). Un point important de cette étude est l'hypothèse que la moxonidine pourrait agir directement sur les récepteurs aux imidazolines présents au cœur, ce qui pourrait démontrer un effet de la moxonidine indépendant de la pression. Cette hypothèse requiert des études additionnelles pour démontrer la localisation cellulaire des récepteurs I_1 et pour étudier les effets de la moxonidine sur ces cellules en l'absence d'effets sur la pression. Donc, la suite logique à cette étude serait d'étudier les effets de la moxonidine séparément sur les deux principaux types cellulaires présents dans le cœur, soit les cardiomyocytes et les fibroblastes. Pour ce faire, il faudra étudier *in vitro* les effets de la moxonidine en utilisant la culture cellulaire. Les fibroblastes cardiaques seront séparés des cardiomyocytes puis, pour recréer les conditions subies en hypertension, ces cellules recevront des concentrations de NE semblables à celles observées *in vivo*. La dynamique de l'ADN (contenu, synthèse et fragmentation) ainsi que certains paramètres de l'apoptose (Bax, Bcl-2, caspase-3) seront étudiés. Nous croyons que la moxonidine induira l'apoptose dans les fibroblastes, réduisant ou inhibant l'hyperplasie des fibroblastes induite par la NE. À l'inverse, nous croyons que la moxonidine aura un effet anti-apoptotique dans les cardiomyocytes, réduisant ainsi la mort de ces cellules.

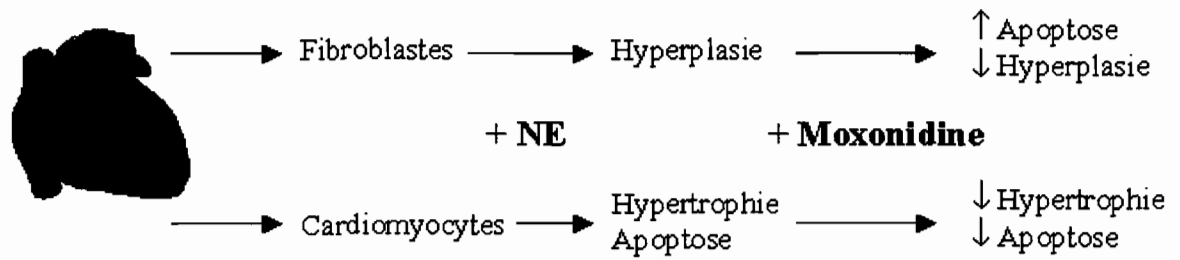


Figure 7. Schéma hypothétique de l'action de la moxonidine sur les fibroblastes cardiaques et sur les cardiomyocytes.

4. Bibliographie

- Abrahamsen, C. T., Barone, F. C., Campbell, W. G., Jr., Nelson, A. H., Contino, L. C., Pullen, M. A., Grygielko, E. T., Edwards, R. M., Laping, N. J., and Brooks, D. P. (2002). The angiotensin type 1 receptor antagonist, eprosartan, attenuates the progression of renal disease in spontaneously hypertensive stroke-prone rats with accelerated hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 301, 21-28.
- Adams, J. M., and Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 26, 61-66.
- Agabiti-Rosei, E. (1994). Evaluation of the cardiac effects of antihypertensive agents. *J Cardiovasc Pharmacol* 23 Suppl 5, S42-48.
- Aiello, E. A., Villa-Abrille, M. C., Escudero, E. M., Portiansky, E. L., Perez, N. G., de Hurtado, M. C., and Cingolani, H. E. (2004). Myocardial hypertrophy of normotensive Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H1229-1235.
- Alahari, S. K., Lee, J. W., and Juliano, R. L. (2000). Nischarin, a novel protein that interacts with the integrin $\alpha 5$ subunit and inhibits cell migration. *J Cell Biol* 151, 1141-1154.
- Aldred, K. L., Harris, P. J., and Eitle, E. (2000). Increased proximal tubule NHE-3 and H⁺-ATPase activities in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 18, 623-628.
- Amador, N., de Jesus Encarnacion, J., Rodriguez, L., Tello, A., Lopez, M., and Guizar, J. M. (2004). Relationship between left ventricular mass and heart sympathetic activity in male obese subjects. *Arch Med Res* 35, 411-415.
- Anderson, P. G., Bishop, S. P., and Digerness, S. B. (1988). Coronary vascular function and morphology in hydralazine treated DOCA salt rats. *J Mol Cell Cardiol* 20, 955-967.

- Antignani, A., and Youle, R. J. (2006). How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol* 18, 685-689.
- Arakawa, K. (1996). Serine protease angiotensin II systems. *J Hypertens Suppl* 14, S3-7.
- Azizi, M., Linhart, A., Alexander, J., Goldberg, A., Menten, J., Sweet, C., and Menard, J. (2000). Pilot study of combined blockade of the renin-angiotensin system in essential hypertensive patients. *J Hypertens* 18, 1139-1147.
- Azizi, M., and Ménard, J. (2004) Combined blockade of the renin-angiotensin system with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Circulation* 109, 2492-2499.
- Bader, M., Zhao, Y., Sander, M., Lee, M. A., Bachmann, J., Bohm, M., Djavidani, B., Peters, J., Mullins, J. J., and Ganten, D. (1992). Role of tissue renin in the pathophysiology of hypertension in TGR(mREN2)27 rats. *Hypertension* 19, 681-686.
- Bartling, B., Milting, H., Schumann, H., Darmer, D., Arusoglu, L., Koerner, M. M., El-Banayosy, A., Koerfer, R., Holtz, J., and Zerkowski, H. R. (1999). Myocardial gene expression of regulators of myocyte apoptosis and myocyte calcium homeostasis during hemodynamic unloading by ventricular assist devices in patients with end-stage heart failure. *Circulation* 100, II216-223.
- Bevan, J. A. (1987). Control of peripheral vascular resistance: evidence based on the in vitro study of resistance arteries. *Clin Invest Med* 10, 568-572.
- Biaggioni, I. (2007). The sympathetic nervous system and blood volume regulation: lessons from autonomic failure patients. *Am J Med Sci* 334, 61-64.
- Bing, J., and Nielsen, K. (1973). Role of the renin-system in normo- and hypertension. Effect of angiotensin-inhibitor (1-sar-8-ala-angiotensin II) on the blood pressure of conscious or anaesthetized normal, nephrectomized and renal hypertensive rats. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 81, 254-262.
- Bisognano, J. D., Weinberger, H. D., Bohlmeyer, T. J., Pende, A., Raynolds, M. V., Sastravaha, A., Roden, R., Asano, K., Blaxall, B. C., Wu, S. C., *et al.* (2000).

- Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 32, 817-830.
- Black, S. C., Huang, J. Q., Rezaiefar, P., Radinovic, S., Eberhart, A., Nicholson, D. W., and Rodger, I. W. (1998). Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 30, 733-742.
- Blumenfeld, J. D. (1993). Hypertension and adrenal disorders. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2, 274-282.
- Bousquet, P., Dontenwill, M., Grenay, H., and Feldman, J. (1998). I1-imidazoline receptors: an update. *J Hypertens Suppl* 16, S1-5.
- Briest, W., Holzl, A., Rassler, B., Deten, A., Leicht, M., Baba, H. A., and Zimmer, H. G. (2001). Cardiac remodeling after long term norepinephrine treatment in rats. *Cardiovasc Res* 52, 265-273.
- Briest, W., Homagk, L., Rassler, B., Ziegelhoffer-Mihalovicova, B., Meier, H., Tannapfel, A., Leiblein, S., Saalbach, A., Deten, A., and Zimmer, H. G. (2004). Norepinephrine-induced changes in cardiac transforming growth factor-beta isoform expression pattern of female and male rats. *Hypertension* 44, 410-418.
- Brilla, C. G. (1994) The cardiac structure-function relationship and the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertension and heart failure. *Curr Opin Cardiol*. 9 Suppl 1. S2-10
- Brilla, C. G., and Weber, K. T. (1992). Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 120, 893-901.
- Bristow, M. R., Hershberger, R. E., Port, J. D., Minobe, W., and Rasmussen, R. (1989). Beta 1- and beta 2-adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Mol Pharmacol* 35, 295-303.
- Brodde, O. E. (1993). Beta-adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacol Ther* 60, 405-430.
- Brook, R. D., and Julius, S. (2000). Autonomic imbalance, hypertension, and cardiovascular risk. *Am J Hypertens* 13, 112S-122S.

- Brunner, H. R., Kirshman, J. D., Sealey, J. E., and Laragh, J. H. (1971). Hypertension of renal origin: evidence for two different mechanisms. *Science* *174*, 1344-1346.
- Cabral, A. M., Carvalhinho, F. B., Vasquez, E. C., and Cicilini, M. A. (1994). Effects of chlorthalidone on ventricular hypertrophy in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* *23*, 1180-1184.
- Calderone, A., Thaik, C. M., Takahashi, N., Chang, D. L., and Colucci, W. S. (1998). Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest* *101*, 812-818.
- Camenzind, E., Nussberger, J., Juillerat, L., Munafo, A., Fischli, W., Coassolo, P., van Brummelen, P., Kleinbloesem, C. H., Waeber, B., and Brunner, H. R. (1991). Effect of the renin response during renin inhibition: oral Ro 42-5892 in normal humans. *J Cardiovasc Pharmacol* *18*, 299-307.
- Campese, V. M., and Park, J. (2006). The kidney and hypertension: over 70 years of research. *J Nephrol* *19*, 691-698.
- Cao, L., and Gardner, D. G. (1995). Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension* *25*, 227-234.
- Carey, R. M., and Siragy, H. M. (2003). The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endocrinol Metab* *14*, 274-281.
- Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1993). Catecholamine receptors: structure, function, and regulation. *Recent Prog Horm Res* *48*, 277-290.
- Chan, P. S., Ronsberg, M. A., and Cervoni, P. (1984). Acute antihypertensive synergism of angiotensin-converting enzyme inhibitors and diuretics. *Fed Proc* *43*, 1346-1350.
- Chang, H. Y., and Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* *64*, 821-846.
- Chen, Z., Chua, C. C., Ho, Y. S., Hamdy, R. C., and Chua, B. H. (2001). Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *280*, H2313-2320.

- Chen, Z. J., and Minneman, K. P. (2005). Recent progress in alpha1-adrenergic receptor research. *Acta Pharmacol Sin* 26, 1281-1287.
- Cigola, E., Kajstura, J., Li, B., Meggs, L. G., and Anversa, P. (1997). Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Exp Cell Res* 231, 363-371.
- Collins, R., Peto, R., MacMahon, S., Hebert, P., Fiebach, N. H., Eberlein, K. A., Godwin, J., Qizilbash, N., Taylor, J. O., and Hennekens, C. H. (1990). Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 335, 827-838.
- Communal, C., Singh, K., Sawyer, D. B., and Colucci, W. S. (1999). Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation* 100, 2210-2212.
- de Champlain, J., Bouvier, M., and Drolet, G. (1987). Abnormal regulation of the sympathoadrenal system in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 65, 1605-1614.
- de Gasparo, M., Hess, P., Nuesslein-Hildesheim, B., Bruneval, P., and Clozel, J. P. (2000). Combination of non-hypotensive doses of valsartan and enalapril improves survival of spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1, 151-158.
- de Leeuw, P. W., and Birkenhager, W. H. (1988). Alpha-adrenoceptors and the kidney. *J Hypertens Suppl* 6, S21-24.
- de Wardener, H. E. (1996). Sodium and the kidney in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 10, 645-648.
- Deng, Y., and Rapp, J. P. (1992). Cosegregation of blood pressure with angiotensin converting enzyme and atrial natriuretic peptide receptor genes using Dahl salt-sensitive rats. *Nat Genet* 1, 267-272.

- Der Sarkissian, S., Marchand, E. L., Duguay, D., Hamet, P., and deBlois, D. (2003). Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. *Cardiovasc Res* 57, 775-783.
- Devereux, R. B., Dahlof, B., Gerds, E., Boman, K., Nieminen, M. S., Papademetriou, V., Rokkedal, J., Harris, K. E., Edelman, J. M., and Wachtell, K. (2004). Regression of hypertensive left ventricular hypertrophy by losartan compared with atenolol: the Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension (LIFE) trial. *Circulation* 110, 1456-1462.
- Dinh, D. T., Frauman, A. G., Johnston, C. I., and Fabiani, M. E. (2001). Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)* 100, 481-492.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., *et al.* (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 87, E1-9.
- Edwards, L., Fishman, D., Horowitz, P., Bourbon, N., Kester, M., and Ernsberger, P. (2001). The I1-imidazoline receptor in PC12 pheochromocytoma cells activates protein kinases C, extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-jun N-terminal kinase (JNK). *J Neurochem* 79, 931-940.
- El-Ayoubi, R., Gutkowska, J., Regunathan, S., and Mukaddam-Daher, S. (2002). Imidazoline receptors in the heart: characterization, distribution, and regulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 39, 875-883.
- El-Ayoubi, R., Menaouar, A., Gutkowska, J., and Mukaddam-Daher, S. (2003). Normalization of up-regulated cardiac imidazoline I(1)-receptors and natriuretic peptides by chronic treatment with moxonidine in spontaneously hypertensive rats. *Ann N Y Acad Sci* 1009, 274-278.
- El-Ayoubi, R., Menaouar, A., Gutkowska, J., and Mukaddam-Daher, S. (2004). Imidazoline receptors but not alpha 2-adrenoceptors are regulated in spontaneously

- hypertensive rat heart by chronic moxonidine treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 310, 446-451.
- Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F., and Lohse, M. J. (1999). Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7059-7064.
- Er, E., Oliver, L., Cartron, P. F., Juin, P., Manon, S., and Vallette, F. M. (2006). Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta* 1757, 1301-1311.
- Ernsberger, P. (1999). The I1-imidazoline receptor and its cellular signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci* 881, 35-53.
- Ernsberger, P. (2000). Pharmacology of moxonidine: an I1-imidazoline receptor agonist. *J Cardiovasc Pharmacol* 35, S27-41.
- Ernsberger, P., Damon, T. H., Graff, L. M., Schafer, S. G., and Christen, M. O. (1993). Moxonidine, a centrally acting antihypertensive agent, is a selective ligand for I1-imidazoline sites. *J Pharmacol Exp Ther* 264, 172-182.
- Ernsberger, P., Koletsky, R. J., Collins, L. A., and Bedol, D. (1996). Sympathetic nervous system in salt-sensitive and obese hypertension: amelioration of multiple abnormalities by a central sympatholytic agent. *Cardiovasc Drugs Ther* 10 Suppl 1, 275-282.
- Esler, M. (2000). The sympathetic system and hypertension. *Am J Hypertens* 13, 99S-105S.
- Esler, M., Lambert, G., and Jennings, G. (1990). Increased regional sympathetic nervous activity in human hypertension: causes and consequences. *J Hypertens Suppl* 8, S53-57.
- Esler, M. D., Hasking, G. J., Willett, I. R., Leonard, P. W., and Jennings, G. L. (1985). Noradrenaline release and sympathetic nervous system activity. *J Hypertens* 3, 117-129.

- Esposito, G., Rapacciuolo, A., Naga Prasad, S. V., Takaoka, H., Thomas, S. A., Koch, W. J., and Rockman, H. A. (2002). Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation* 105, 85-92.
- Fernandez-Alfonso, M. S., Ganten, D., and Paul, M. (1992). Mechanisms of cardiac growth. The role of the renin-angiotensin system. *Basic Res Cardiol* 87 Suppl 2, 173-181.
- Ferrari, P. (2003). Cortisol and the renal handling of electrolytes: role in glucocorticoid-induced hypertension and bone disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17, 575-589.
- Ferrari, R. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibition in cardiovascular disease: evidence with perindopril. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 3, 15-29.
- Finnegan, P. M., and Gleason, B. L. (2003). Combination ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers for hypertension. *Ann Pharmacother* 37, 886-889.
- Flack, J. M., Peters, R., Shafi, T., Alrefai, H., Nasser, S. A., and Crook, E. (2003). Prevention of hypertension and its complications: theoretical basis and guidelines for treatment. *J Am Soc Nephrol* 14, S92-98.
- Folkow, B. (1989). Sympathetic nervous control of blood pressure. Role in primary hypertension. *Am J Hypertens* 2, 103S-111S.
- Fortuno, M. A., Ravassa, S., Fortuno, A., Zalba, G., and Diez, J. (2001). Cardiomyocyte apoptotic cell death in arterial hypertension: mechanisms and potential management. *Hypertension* 38, 1406-1412.
- Freude, B., Masters, T. N., Kostin, S., Robicsek, F., and Schaper, J. (1998). Cardiomyocyte apoptosis in acute and chronic conditions. *Basic Res Cardiol* 93, 85-89.
- Frey, N., Katus, H. A., Olson, E. N., and Hill, J. A. (2004). Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 109, 1580-1589.
- Fuller, P. J., and Young, M. J. (2005). Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension* 46, 1227-1235.

- Ganten, D., Hermann, K., Unger, T., and Lang, R. E. (1983). The tissue renin-angiotensin systems: focus on brain angiotensin, adrenal gland and arterial wall. *Clin Exp Hypertens A* 5, 1099-1118.
- Gomez-Sanchez, E. P., Zhou, M., and Gomez-Sanchez, C. E. (1996). Mineralocorticoids, salt and high blood pressure. *Steroids* 61, 184-188.
- Gradman, A. H., and Alfayoumi, F. (2006). From left ventricular hypertrophy to congestive heart failure: management of hypertensive heart disease. *Prog Cardiovasc Dis* 48, 326-341.
- Grassi, G. (2004). Counteracting the sympathetic nervous system in essential hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13, 513-519.
- Grassi, G., Seravalle, G., Cattaneo, B. M., Lanfranchi, A., Vailati, S., Giannattasio, C., Del Bo, A., Sala, C., Bolla, G. B., and Pozzi, M. (1995). Sympathetic activation and loss of reflex sympathetic control in mild congestive heart failure. *Circulation* 92, 3206-3211.
- Greenwood, J. P., Scott, E. M., Stoker, J. B., and Mary, D. A. (2000). Chronic I(1)-imidazoline agonism : sympathetic mechanisms in hypertension. *Hypertension* 35, 1264-1269.
- Gustafsson, A. B., Tsai, J. G., Logue, S. E., Crow, M. T., and Gottlieb, R. A. (2004). Apoptosis repressor with caspase recruitment domain protects against cell death by interfering with Bax activation. *J Biol Chem* 279, 21233-21238.
- Guyton, A. C. (1991). Abnormal renal function and autoregulation in essential hypertension. *Hypertension* 18, III49-53.
- Guyton, A. C., Cowley, A. W., Jr., Young, D. B., Coleman, T. G., Hall, J. E., and DeClue, J. W. (1976). Integration and control of circulatory function. *Int Rev Physiol* 9, 341-385.
- Gyamlani, G., and Geraci, S. A. (2007). Secondary hypertension due to drugs and toxins. *South Med J* 100, 692-699; quiz 700, 708.

- Hamet, P., Richard, L., Dam, T. V., Teiger, E., Orlov, S. N., Gaboury, L., Gossard, F., and Tremblay, J. (1995). Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 26, 642-648.
- Harris, P. (1994). The problem of defining heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 8, 447-452.
- Haxhiu, M. A., Dreshaj, I., Schafer, S. G., and Ernsberger, P. (1994). Selective antihypertensive action of moxonidine is mediated mainly by II-imidazoline receptors in the rostral ventrolateral medulla. *J Cardiovasc Pharmacol* 24 *Suppl* 1, S1-8.
- Hayakawa, Y., Chandra, M., Miao, W., Shirani, J., Brown, J. H., Dorn, G. W., 2nd, Armstrong, R. C., and Kitsis, R. N. (2003). Inhibition of cardiac myocyte apoptosis improves cardiac function and abolishes mortality in the peripartum cardiomyopathy of Galpha(q) transgenic mice. *Circulation* 108, 3036-3041.
- Head, G. A., and Mayorov, D. N. (2006). Imidazoline receptors, novel agents and therapeutic potential. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 4, 17-32.
- Hein, S., Arnon, E., Kostin, S., Schonburg, M., Elsasser, A., Polyakova, V., Bauer, E. P., Klovekorn, W. P., and Schaper, J. (2003). Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 107, 984-991.
- Hill-Kapturczak, N., Kapturczak, M. H., Block, E. R., Patel, J. M., Malinski, T., Madsen, K. M., and Tisher, C. C. (1999). Angiotensin II-stimulated nitric oxide release from porcine pulmonary endothelium is mediated by angiotensin IV. *J Am Soc Nephrol* 10, 481-491.
- Hinojos, C. A., and Doris, P. A. (2004). Altered subcellular distribution of Na⁺,K⁺-ATPase in proximal tubules in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 44, 95-100.
- Hitomi, J., Katayama, T., Taniguchi, M., Honda, A., Imaizumi, K., and Tohyama, M. (2004). Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neurosci Lett* 357, 127-130.

- Hochhauser, E., Kivity, S., Offen, D., Maulik, N., Otani, H., Barhum, Y., Pannet, H., Shneyvays, V., Shainberg, A., Goldshtaub, V., *et al.* (2003). Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, H2351-2359.
- Horio, T., Nishikimi, T., Yoshihara, F., Matsuo, H., Takishita, S., and Kangawa, K. (2000). Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension* 35, 19-24.
- Horiuchi, M., Lehtonen, J. Y., and Daviet, L. (1999) Signaling Mechanism of the AT₂ Angiotensin II Receptor: Crosstalk between AT₁ and AT₂ Receptors in Cell Growth., *Trends Endocrinol Metab.* 10, 391-396.
- Howe, P. R., Provis, J. C., West, M. J., and Chalmers, J. P. (1979). Changes in cardiac norepinephrine in spontaneously hypertensive and stroke-prone rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1, 115-122.
- Huang, J. Q., Radinovic, S., Rezaiefar, P., and Black, S. C. (2000). In vivo myocardial infarct size reduction by a caspase inhibitor administered after the onset of ischemia. *Eur J Pharmacol* 402, 139-142.
- Ikonomidis, J. S., Salerno, T. A., and Wittnich, C. (1990). Calcium and the heart: an essential partnership. *Can J Cardiol* 6, 305-316.
- Inoko, M., Kihara, Y., Morii, I., Fujiwara, H., and Sasayama, S. (1994). Transition from compensatory hypertrophy to dilated, failing left ventricles in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol* 267, H2471-2482.
- Irlbeck, M., Muhling, O., Iwai, T., and Zimmer, H. G. (1996). Different response of the rat left and right heart to norepinephrine. *Cardiovasc Res* 31, 157-162.
- Ishimitsu, T., Kobayashi, T., Honda, T., Takahashi, M., Minami, J., Ohta, S., Inada, H., Yoshii, M., Ono, H., and Matsuoka, H. (2005). Protective effects of an angiotensin II receptor blocker and a long-acting calcium channel blocker against cardiovascular organ injuries in hypertensive patients. *Hypertens Res* 28, 351-359.

- Iwai, N., Shimoike, H., and Kinoshita, M. (1995). Cardiac renin-angiotensin system in the hypertrophied heart. *Circulation* 92, 2690-2696.
- Jacinto, S. M., Mullins, J. J., and Mitchell, K. D. (1999). Enhanced renal vascular responsiveness to angiotensin II in hypertensive ren-2 transgenic rats. *Am J Physiol* 276, F315-322.
- Jacob, F., Clark, L. A., Guzman, P. A., and Osborn, J. W. (2005). Role of renal nerves in development of hypertension in DOCA-salt model in rats: a telemetric approach. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H1519-1529.
- James, T. N. (1998). Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. *Annu Rev Physiol* 60, 309-325.
- Jin, X. Q., Chen, D. G., Zhang, S., and Wang, H. J. (1994). Effects of captopril and clonidine on resting and stress cardiac performance of left ventricle in spontaneously hypertensive rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 15, 501-506.
- Judy, W. V., Watanabe, A. M., Henry, D. P., Besch, H. R., Jr., Murphy, W. R., and Hockel, G. M. (1976). Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res* 38, 21-29.
- Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W. A., Sonnenblick, E. H., Krajewski, S., Reed, J. C., Olivetti, G., and Anversa, P. (1996). Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 74, 86-107.
- Kalra, P. A. (2007). Renal specific secondary hypertension. *J Ren Care* 33, 4-10.
- Kang, P. M., and Izumo, S. (2003). Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases. *Trends Mol Med* 9, 177-182.
- Kang, S. J., Wang, S., Hara, H., Peterson, E. P., Namura, S., Amin-Hanjani, S., Huang, Z., Srinivasan, A., Tomaselli, K. J., Thornberry, N. A., *et al.* (2000). Dual role of caspase-11 in mediating activation of caspase-1 and caspase-3 under pathological conditions. *J Cell Biol* 149, 613-622.

- Kapusta, D. R., Jones, S. Y., Kopp, U. C., and Dibona, G. F. (1989). Role of renal nerves in excretory responses to exogenous and endogenous opioid peptides. *J Pharmacol Exp Ther* 248, 1039-1047.
- Kawabe, K., Watanabe, T. X., Shiono, K., and Sokabe, H. (1978). Influence on blood pressure of renal isografts between spontaneously hypertensive and normotensive rats, utilizing the F1 hybrids. *Jpn Heart J* 19, 886-894.
- Kimura, G., Sanai, T., Saito, F., and Uzu, T. (1996). Renal determinants for sodium sensitivity of blood pressure. *Hypertension* 28, 1102-1103.
- Knaapen, M. W., Davies, M. J., De Bie, M., Haven, A. J., Martinet, W., and Kockx, M. M. (2001). Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res* 51, 304-312.
- Koglin, J., and Russell, M. E. (1999). Alloimmune-mediated apoptosis: comparison in mouse models of acute and chronic cardiac rejection. *Transplantation* 67, 904-909.
- Koletsky, S., Pavlicko, K. M., and Rivera-Velez, J. M. (1971). Renin-angiotensin activity in hypertensive rats with a single ischemic kidney. *Lab Invest* 24, 41-44.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W., and Reed, J. C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53, 4701-4714.
- Kumar, D., Kirshenbaum, L. A., Li, T., Danelisen, I., and Singal, P. K. (2001). Apoptosis in adriamycin cardiomyopathy and its modulation by probucol. *Antioxid Redox Signal* 3, 135-145.
- Langheinrich, M., Lee, M. A., Bohm, M., Pinto, Y. M., Ganten, D., and Paul, M. (1996). The hypertensive Ren-2 transgenic rat TGR (mREN2)27 in hypertension research. Characteristics and functional aspects. *Am J Hypertens* 9, 506-512.
- Lavie, C. J., and Messerli, F. H. (1986). Cardiovascular adaptation to obesity and hypertension. *Chest* 90, 275-279.

- Lavoie, J. L., and Sigmund, C. D. (2003). Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 144, 2179-2183.
- Lee, T. M., Lin, M. S., Tsai, C. H., and Chang, N. C. (2006). Effect of pravastatin on left ventricular mass in the two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H2705-2713.
- Lewington, S., Clarke, R., Qizilbash, N., Peto, R., and Collins, R. (2002). Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 360, 1903-1913.
- Li, G., Regunathan, S., Barrow, C. J., Eshraghi, J., Cooper, R., and Reis, D. J. (1994). Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science* 263, 966-969.
- Li, J. S., Sventek, P., and Schiffrin, E. L. (1996). Effect of antihypertensive treatment and N omega-nitro-L-arginine methyl ester on cardiovascular structure in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 14, 1331-1339.
- Li, Y., and Cohen, R. (2005). Caspase inhibitors and myocardial apoptosis. *Int Anesthesiol Clin* 43, 77-89.
- Liao, Y., Asakura, M., Takashima, S., Ogai, A., Asano, Y., Shintani, Y., Minamino, T., Asanuma, H., Sanada, S., Kim, J., *et al.* (2004). Celiprolol, a vasodilatory beta-blocker, inhibits pressure overload-induced cardiac hypertrophy and prevents the transition to heart failure via nitric oxide-dependent mechanisms in mice. *Circulation* 110, 692-699.
- Lohmeier, T. E., Mizelle, H. L., Reinhart, G. A., Montani, J. P., Hord, C. E., Jr., and Didlake, R. H. (1996). Atrial natriuretic peptide and sodium homeostasis in compensated heart failure. *Am J Physiol* 271, R1353-1363.
- Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15.

- Mall, G., Greber, D., Gharenhbaghi, H., Wiest, G., Amann, K., and Mattfeldt, T. (1991). Effects of nifedipine and moxonidine on cardiac structure in spontaneously hypertensive rats (SHR)--stereological studies on myocytes, capillaries, arteries, and cardiac interstitium. *Basic Res Cardiol* 86 Suppl 3, 33-44.
- Mallion, J. M., Boutelant, S., Chabaux, P., Baguet, J. P., Muller, M., Meilenbrock, S., Heath, R., and Bodin, F. (1997). Valsartan, a new angiotensin II antagonist; blood pressure reduction in essential hypertension compared with an angiotensin converting enzyme inhibitor, enalapril. *Blood Press Monit* 2, 179-184.
- Mancia, G., Grassi, G., Parati, G., and Zanchetti, A. (1997). The sympathetic nervous system in human hypertension. *Acta Physiol Scand Suppl* 640, 117-121.
- Marcus, R. H., Korcarz, C., McCray, G., Neumann, A., Murphy, M., Borow, K., Weinert, L., Bednarz, J., Gretler, D. D., Spencer, K. T., and et al. (1994). Noninvasive method for determination of arterial compliance using Doppler echocardiography and subclavian pulse tracings. Validation and clinical application of a physiological model of the circulation. *Circulation* 89, 2688-2699.
- Mark, A. L. (1996). The sympathetic nervous system in hypertension: a potential long-term regulator of arterial pressure. *J Hypertens Suppl* 14, S159-165.
- Martin, J., and Krum, H. (2002). Role of valsartan and other angiotensin receptor blocking agents in the management of cardiovascular disease. *Pharmacol Res* 46, 203-212.
- Mathew, J., Sleight, P., Lonn, E., Johnstone, D., Pogue, J., Yi, Q., Bosch, J., Sussex, B., Probstfield, J., and Yusuf, S. (2001). Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril. *Circulation* 104, 1615-1621.
- McCarty, R., Chiueh, C. C., and Kopin, I. J. (1978). Spontaneously hypertensive rats: adrenergic hyperresponsivity to anticipation of electric shock. *Behav Biol* 23, 180-188.

- McConnaughey, M. M., McConnaughey, J. S., and Ingenito, A. J. (1999). Practical considerations of the pharmacology of angiotensin receptor blockers. *J Clin Pharmacol* 39, 547-559.
- Menaouar, A., El-Ayoubi, R., Jankowski, M., Gutkowska, J., and Mukaddam-Daher, S. (2002). Chronic imidazoline receptor activation in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 15, 803-808.
- Mendlowitz, M. (1991). The aetiology of essential hypertension. *J Hum Hypertens* 5, 455-460.
- Menegaz, R. G., Kapusta, D. R., Mauad, H., and de Melo Cabral, A. (2001). Activation of alpha(2)-receptors in the rostral ventrolateral medulla evokes natriuresis by a renal nerve mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R98-R107.
- Meredith, I. T., Eisenhofer, G., Lambert, G. W., Dewar, E. M., Jennings, G. L., and Esler, M. D. (1993). Cardiac sympathetic nervous activity in congestive heart failure. Evidence for increased neuronal norepinephrine release and preserved neuronal uptake. *Circulation* 88, 136-145.
- Messerli, F. (2000). Moxonidine: a new and versatile antihypertensive. *J Cardiovasc Pharmacol* 35, S53-56.
- Messerli, F. H., Williams, B., and Ritz, E. (2007). Essential hypertension. *Lancet* 370, 591-603.
- Mitchell, K. D., Jacinto, S. M., and Mullins, J. J. (1997). Proximal tubular fluid, kidney, and plasma levels of angiotensin II in hypertensive ren-2 transgenic rats. *Am J Physiol* 273, F246-253.
- Moorjani, N., Catarino, P., Trabzuni, D., Saleh, S., Moorji, A., Dzimiri, N., Al-Mohanna, F., Westaby, S., and Ahmad, M. (2007). Upregulation of Bcl-2 proteins during the transition to pressure overload-induced heart failure. *Int J Cardiol* 116, 27-33.
- Mosqueda-Garcia, R., Inagami, T., Appalsamy, M., Sugiura, M., and Robertson, R. M. (1993). Endothelin as a neuropeptide. Cardiovascular effects in the brainstem of normotensive rats. *Circ Res* 72, 20-35.

- Moudgil, R., Menon, V., Xu, Y., Musat-Marcu, S., Kumar, D., and Jugdutt, B. I. (2001). Postischemic apoptosis and functional recovery after angiotensin II type 1 receptor blockade in isolated working rat hearts. *J Hypertens* 19, 1121-1129.
- Mukaddam-Daher, S., and Gutkowska, J. (2000). Atrial natriuretic peptide is involved in renal actions of moxonidine. *Hypertension* 35, 1215-1220.
- Mukaddam-Daher, S., Menaouar, A., and Gutkowska, J. (2006). Receptors involved in moxonidine-stimulated atrial natriuretic peptide release from isolated normotensive rat hearts. *Eur J Pharmacol* 541, 73-79.
- Mulatero, P., Morra di Cella, S., and Veglio, F. (2002). Hypertension, genotype and oral contraceptives. *Pharmacogenomics* 3, 57-63.
- Mulvany, M. J. (2002). Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 4, 49-55.
- Naber, C. K., and Siffert, W. (2004). Genetics of human arterial hypertension. *Minerva Med* 95, 347-356.
- Narula, J., Haider, N., Virmani, R., DiSalvo, T. G., Kolodgie, F. D., Hajjar, R. J., Schmidt, U., Semigran, M. J., Dec, G. W., and Khaw, B. A. (1996). Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 335, 1182-1189.
- Neisius, D., Wood, J. M., and Hofbauer, K. G. (1986). Renal vasodilatation after inhibition of renin or converting enzyme in marmoset. *Am J Physiol* 251, H897-902.
- Nguyen, G., Burckle, C. A., and Sraer, J. D. (2004). Renin/prorenin-receptor biochemistry and functional significance. *Curr Hypertens Rep* 6, 129-132.
- Nguyen, G., Delarue, F., Burckle, C., Bouzahir, L., Giller, T., and Sraer, J. D. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 109, 1417-1427.
- Nguyen, M., Branton, P. E., Walton, P. A., Oltvai, Z. N., Korsmeyer, S. J., and Shore, G. C. (1994). Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus. *J Biol Chem* 269, 16521-16524.

- Norrelund, H., Christensen, K. L., Samani, N. J., Kimber, P., Mulvany, M. J., and Korsgaard, N. (1994). Early narrowed afferent arteriole is a contributor to the development of hypertension. *Hypertension* 24, 301-308.
- Okamoto, K., and Aoki, K. (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 27, 282-293
- Olivetti, G., Abbi, R., Quaini, F., Kajstura, J., Cheng, W., Nitahara, J. A., Quaini, E., Di Loreto, C., Beltrami, C. A., Krajewski, S., *et al.* (1997). Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 336, 1131-1141.
- Olivetti, G., Quaini, F., Sala, R., Lagrasta, C., Corradi, D., Bonacina, E., Gambert, S. R., Cigola, E., and Anversa, P. (1996). Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol* 28, 2005-2016.
- Omland, T., Lie, R. T., Aakvaag, A., Aarsland, T., and Dickstein, K. (1994). Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* 89, 1573-1579.
- Onusko, E. (2003). Diagnosing secondary hypertension. *Am Fam Physician* 67, 67-74.
- Oparil, S., Zaman, M. A. and Calhoun, D. A. (2003) Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med* 139, 761-776
- Otero, M. L., Martell, N., Aubele, A. L., Rodrigo, J. L., Herrero, M., Moya, J., Egocheaga, I., Fernandez-Cruz, A., and Fernandez Pinilla, C. (1997). Volume overload, atrial natriuretic peptide, and left ventricular hypertrophy. *Adv Exp Med Biol* 432, 103-109.
- Patschan, O., Kuttler, B., Heemann, U., Uber, A., and Rettig, R. (1997). Kidneys from normotensive donors lower blood pressure in young transplanted spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 273, R175-180.
- Paula, R. D., Lima, C. V., Khosla, M. C., and Santos, R. A. (1995). Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension* 26, 1154-1159.

- Peng, H., Carretero, O. A., Vuljaj, N., Liao, T. D., Motivala, A., Peterson, E. L., and Rhaleb, N. E. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitors: a new mechanism of action. *Circulation* 112, 2436-2445.
- Perry, R. S., and Illsley, S. S. (1986). Basic cardiac electrophysiology and mechanisms of antiarrhythmic agents. *Am J Hosp Pharm* 43, 957-974.
- Persson, A. E., Ollerstam, A., Liu, R., and Brown, R. (2004). Mechanisms for macula densa cell release of renin. *Acta Physiol Scand* 181, 471-474.
- Pettinger, W. A., and Mitchell, H. C. (1988). Side effects of vasodilator therapy. *Hypertension* 11, 1134-36.
- Phillips, M. I., Shen, L., Richards, E. M., and Raizada, M. K. (1993). Immunohistochemical mapping of angiotensin AT1 receptors in the brain. *Regul Pept* 44, 95-107.
- Pinthong, D., Songsermsakul, P., Rattanachamnong, P., and Kendall, D. A. (2004). The effects of imidazoline agents on the aggregation of human platelets. *J Pharm Pharmacol* 56, 213-220.
- Pinto, Y. M., Paul, M., and Ganten, D. (1998). Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res* 39, 77-88.
- Pool, J. L. (2007). Direct renin inhibition: focus on aliskiren. *J Manag Care Pharm* 13, 21-33.
- Prichard, B. N., and Graham, B. R. (1997). The use of moxonidine in the treatment of hypertension. *J Hypertens Suppl* 15, S47-55.
- Psaty, B. M., Lumley, T., Furberg, C. D., Schellenbaum, G., Pahor, M., Alderman, M. H., and Weiss, N. S. (2003). Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: a network meta-analysis. *Jama* 289, 2534-2544.
- Quast, U. (1992). Potassium channel openers: pharmacological and clinical aspects. *Fundam Clin Pharmacol* 6, 279-293.

- Raasch, W., Jungbluth, B., Schafer, U., Hauser, W., and Dominiak, P. (2003). Modification of noradrenaline release in pithed spontaneously hypertensive rats by I1-binding sites in addition to alpha2-adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 1063-1071.
- Ramirez, M. T., Post, G. R., Sulakhe, P. V., and Brown, J. H. (1995). M1 muscarinic receptors heterologously expressed in cardiac myocytes mediate Ras-dependent changes in gene expression. *J Biol Chem* 270, 8446-8451.
- Rapp, J. P. (1982). Dahl salt-susceptible and salt-resistant rats. A review. *Hypertension* 4, 753-763.
- Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157, 1415-1430.
- Richer, C., Vacher, E., Fornes, P., and Giudicelli, J. F. (1997). Antihypertensive drugs in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens* 19, 925-936.
- Roman, R. J. (1987). Altered pressure-natriuresis relationship in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 9, III130-136.
- Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., and Borner, C. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499.
- Ruppert, V., and Maisch, B. (2003). Genetics of human hypertension. *Herz* 28, 655-662.
- Ryan, K. M., Phillips, A. C., and Vousden, K. H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 13, 332-337.
- Sadoshima, J., Xu, Y., Slayter, H. S., and Izumo, S. (1993). Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75, 977-984.
- Safar, M. E., Henry, O., and Meaume, S. (2002). Aortic pulse wave velocity: an independent marker of cardiovascular risk. *Am J Geriatr Cardiol* 11, 295-298.
- Saito, F., and Kimura, G. (1996). Antihypertensive mechanism of diuretics based on pressure-natriuresis relationship. *Hypertension* 27, 914-918.

- Schlaich, M. P., Kaye, D. M., Lambert, E., Sommerville, M., Socratous, F., and Esler, M. D. (2003). Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circulation* 108, 560-565.
- Schleiffer, R., and Gairard, A. (1995). Blood pressure effects of calcium intake in experimental models of hypertension. *Semin Nephrol* 15, 526-535.
- Schobel, H. P., Langenfeld, M., Gatzka, C., and Schmieder, R. E. (1996). Treatment and post-treatment effects of alpha- versus beta-receptor blockers on left ventricular structure and function in essential hypertension. *Am Heart J* 132, 1004-1009.
- Schunkert, H., Dzau, V. J., Tang, S. S., Hirsch, A. T., Apstein, C. S., and Lorell, B. H. (1990). Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest* 86, 1913-1920.
- Shin, J., and Johnson, J. A. (2007). Pharmacogenetics of beta-blockers. *Pharmacotherapy* 27, 874-887.
- Signolet, I. L., Bousquet, P. P., and Monassier, L. J. (2008). Improvement of cardiac diastolic function by long-term centrally mediated sympathetic inhibition in one-kidney, one-clip hypertensive rabbits. *Am J Hypertens* 21, 54-60.
- Simpson, P. (1983). Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *J Clin Invest* 72, 732-738.
- Sleight, P. (1984). Hemodynamics in hypertension and heart failure. *Am J Med* 76, 3-13.
- Smulyan, H., and Safar, M. E. (1997). Systolic blood pressure revisited. *J Am Coll Cardiol* 29, 1407-1413.
- Staessen, J. A., Li, Y., and Richart, T. (2006). Oral renin inhibitors. *Lancet* 368, 1449-1456.
- Streeten, D. H., and Anderson, G. H. (1992). Secondary hypertension. An overview of its causes and management. *Drugs* 43, 805-819.
- Sun, Z., Chang, C. H., and Ernsberger, P. (2007). Identification of IRAS/Nischarin as an I1-imidazoline receptor in PC12 rat pheochromocytoma cells. *J Neurochem* 101, 99-108.

- Suzuki, J., Matsubara, H., Urakami, M., and Inada, M. (1993). Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. *Circ Res* 73, 439-447.
- Swedberg, K., Bergh, C. H., Dickstein, K., McNay, J., and Steinberg, M. (2000). The effects of moxonidine, a novel imidazoline, on plasma norepinephrine in patients with congestive heart failure. Moxonidine Investigators. *J Am Coll Cardiol* 35, 398-404.
- Swedberg, K., Bristow, M. R., Cohn, J. N., Dargie, H., Straub, M., Wiltse, C., and Wright, T. J. (2002). Effects of sustained-release moxonidine, an imidazoline agonist, on plasma norepinephrine in patients with chronic heart failure. *Circulation* 105, 1797-1803.
- Tea, B. S., Dam, T. V., Moreau, P., Hamet, P., and deBlois, D. (1999). Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension* 34, 229-235.
- Tea, B. S., Der Sarkissian, S., Touyz, R. M., Hamet, P., and deBlois, D. (2000). Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension* 35, 1069-1073.
- Teisman, A. C., Pinto, Y. M., Buikema, H., Flesch, M., Bohm, M., Paul, M., and van Gilst, W. H. (1998). Dissociation of blood pressure reduction from end-organ damage in TGR(mREN2)27 transgenic hypertensive rats. *J Hypertens* 16, 1759-1765.
- Thoren, P., and Ricksten, S. E. (1979). Recordings of renal and splanchnic sympathetic nervous activity in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)* 57 Suppl 5, 197s-199s.
- Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Tipnis, S. R., Hooper, N. M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., and Turner, A. J. (2000). A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional

- expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 275, 33238-33243.
- Vakili, B. A., Okin, P. M., and Devereux, R. B. (2001). Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J* 141, 334-341.
- van den Eijnden, M. M., Leuvenink, H. G., Ottens, P. J., t Hart, N. A., van Oeveren, W., Morariu, A. M., van Goor, H., and Ploeg, R. J. (2003). Effect of brain death and non-heart-beating kidney donation on renal function and injury: an assessment in the isolated perfused rat kidney. *Exp Clin Transplant* 1, 85-95.
- van Empel, V. P., and De Windt, L. J. (2004). Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act. *Cardiovasc Res* 63, 487-499.
- Van Kerckhoven, R., van Veen, T. A., Boomsma, F., Saxena, P. R., and Schoemaker, R. G. (2000). Chronic administration of moxonidine suppresses sympathetic activation in a rat heart failure model. *Eur J Pharmacol* 397, 113-120.
- Van Kerckhoven, R., van Veghel, R., Saxena, P. R., and Schoemaker, R. G. (2004). Pharmacological therapy can increase capillary density in post-infarction remodeled rat hearts. *Cardiovasc Res* 61, 620-629.
- Varo, N., Etayo, J. C., Zalba, G., Beaumont, J., Iraburu, M. J., Montiel, C., Gil, M. J., Monreal, I., and Diez, J. (1999). Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 17, 107-114.
- Vatner, S. F. (1985). Regulation of coronary resistance vessels and large coronary arteries. *Am J Cardiol* 56, 16E-22E.
- Vliegen, H. W., van der Laarse, A., Cornelisse, C. J., and Eulerink, F. (1991). Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur Heart J* 12, 488-494.
- Wagner, M., Mascareno, E., and Siddiqui, M. A. (1999). Cardiac hypertrophy: signal transduction, transcriptional adaptation, and altered growth control. *Ann N Y Acad Sci* 874, 1-10.

- Wakatsuki, T., Schlessinger, J., and Elson, E. L. (2004). The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. *Trends Biochem Sci* 29, 609-617.
- Wang, J., and Lenardo, M. J. (2000). Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Sci* 113 (Pt 5), 753-757.
- Wang, Y. X., Gavras, I., Wierzbica, T., and Gavras, H. (1992). Comparison of systemic and regional hemodynamic effects of a diuretic, an angiotensin II receptor antagonist, and an angiotensin-converting enzyme inhibitor in conscious renovascular hypertensive rats. *J Lab Clin Med* 119, 267-272.
- Weber, K. T., Jalil, J. E., Janicki, J. S., and Pick, R. (1989). Myocardial collagen remodeling in pressure overload hypertrophy. A case for interstitial heart disease. *Am J Hypertens* 2, 931-940.
- Wenzel, R. R., Czyborra, P., Luscher, T., and Philipp, T. (1999). Endothelin in cardiovascular control: the role of endothelin antagonists. *Curr Hypertens Rep* 1, 79-87.
- Wenzel, R. R., Fleisch, M., Shaw, S., Noll, G., Kaufmann, U., Schmitt, R., Jones, C. R., Clozel, M., Meier, B., and Luscher, T. F. (1998). Hemodynamic and coronary effects of the endothelin antagonist bosentan in patients with coronary artery disease. *Circulation* 98, 2235-2240.
- Wesson, D. E. (2001). Hypertension and the kidney. *Curr Hypertens Rep* 3, 511-516.
- Witherow, F. N., Helmy, A., Webb, D. J., Fox, K. A., and Newby, D. E. (2001). Bradykinin contributes to the vasodilator effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with heart failure. *Circulation* 104, 2177-2181.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., and Reed, J. C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115, 2656-2664.
- Yamori, Y. (1976). Neural and non-neural mechanisms in spontaneous hypertension. *Clin Sci Mol Med Suppl* 3, 431s-434s.

- Yanagisawa, T., Yamagishi, T., and Okada, Y. (1993). Hyperpolarization induced by K⁺ channel openers inhibits Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release in coronary artery. *Cardiovasc Drugs Ther* 7 *Suppl* 3, 565-574.
- Yaoita, H., Ogawa, K., Maehara, K., and Maruyama, Y. (1998). Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 97, 276-281.
- Yasunari, K., Maeda, K., Nakamura, M., Watanabe, T., Yoshikawa, J., and Hirohashi, K. (2005). Left ventricular hypertrophy and angiotensin II receptor blocking agents. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 3, 61-67.
- Yedinak, K. C. (1993). Use of calcium channel antagonists for cardiovascular disease. *Am Pharm NS33*, 49-64; quiz 64-46.
- Youle, R. J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
- Zhao, Z. Q., Budde, J. M., Morris, C., Wang, N. P., Velez, D. A., Muraki, S., Guyton, R. A., and Vinten-Johansen, J. (2001). Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J Mol Cell Cardiol* 33, 57-68.
- Zhu, H., Poole, J., Lu, Y., Harshfield, G. A., Treiber, F. A., Snieder, H., and Dong, Y. (2005). Sympathetic nervous system, genes and human essential hypertension. *Curr Neurovasc Res* 2, 303-317.
- Ziegler, D., Haxhiu, M. A., Kaan, E. C., Papp, J. G., and Ernsberger, P. (1996). Pharmacology of moxonidine, an 11-imidazoline receptor agonist. *J Cardiovasc Pharmacol* 27 *Suppl* 3, S26-37.
- Zierhut, W., and Zimmer, H. G. (1989). Significance of myocardial alpha- and beta-adrenoceptors in catecholamine-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* 65, 1417-1425.